

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Untersuchung zur Wiederherstellung des  
positiven Feedback Mechanismus von Estradiol-17 $\beta$  und  
zur Sekretion von Estradiol-17 $\beta$  im Verlauf des Anöstrus  
der Hündin**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von  
Ruth Klein

Giessen 1999

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Betreuer: Prof. Dr. B. Hoffmann

**Untersuchung zur Wiederherstellung des  
positiven Feedback Mechanismus von Estradiol-17 $\beta$  und  
zur Sekretion von Estradiol-17 $\beta$  im Verlauf des Anöstrus  
der Hündin**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von  
**Ruth Klein**  
Tierärztin aus Schmallenberg

Giessen 1999

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Hartwig Bostedt

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hoffmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.99

mi t besonderem Dank

an

mei ne El tern

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1.	Die rückkoppelnde Wirkung von Östrogenen	2
2.1.1.	Allgemeines	2
2.1.2.	Ontogenetische Entwicklung der positiv rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$	4
2.1.3.	Interaktion endogener Opioide mit der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse	7
2.1.4.	Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) - Hormon des Hypothalamus	10
2.1.4.1.	Herkunft	10
2.1.4.2.	Sekretion	11
2.1.4.3.	Bindung und Wirkung an der Hypophyse	13
2.1.5.	Gonadotropine	13
2.1.5.1.	Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH)	13
2.1.5.1.	Prolaktin	15
2.1.6.	Rolle von Hormonen ovariellen Ursprungs	16
2.1.6.1.	Östrogene	16
2.1.6.1.1.	Herkunft	16
2.1.6.1.2.	Wirkungen von Estradiol-17 $\beta$ am Hypothalamus–Hypophysensystem	17
2.1.6.1.2.1.	Steroidpriming und negativer Feedback	18
2.1.6.1.2.2.	Positiver Feedback	20
2.1.6.2.	Progesteron	21
2.1.6.2.1.	Herkunft	21
2.1.6.2.2.	Rezeptorbindung von Progesteron und Wirkung am Hypothalamus-Hypophysensystem	22
2.1.6.3.	Inhibin	24
2.1.7.	Weitere Einflußfaktoren	24
2.2.	Effekte der Kastration	25

2.3.	Der Reproduktionszyklus der Hündin	26
2.3.1.	Einteilung der Zyklusphasen	26
2.3.2.	Morphologische und hormonelle Veränderungen während der Zyklus-phasen	26
2.3.2.1.	Proöstrus	26
2.3.2.2.	Östrus	27
2.3.2.3.	Diöstrus	28
2.3.2.4.	Anöstrus	29
2.3.2.4.1.	Grundlegende Aspekte der neuro-endokrinen Regulation des Anöstrus	30
2.3.2.4.2.	Saisonaler Anöstrus	31
2.3.2.4.3.	Laktationsanöstrus	34
2.3.2.4.4.	Der Anöstrus des Hundes	35
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>38</b>
3.1.	Vorversuche zur Festlegung des Behandlungsschemas mit Estradiol-17 $\beta$	38
3.1.1.	Tiermaterial	38
3.1.2.	Durchführung der Vorversuche	38
3.2.	Hauptversuche	39
3.2.1.	Tiermaterial	39
3.2.2.	Durchführung der Untersuchungen zur LH-Freisetzung	40
3.2.2.1.	Versuchsphasen	41
3.2.2.2.	Kontrollphasen	42
3.2.2.3.	Versuchsphase Kastration	42
3.2.2.4.	Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$ und Vehikel	42
3.2.2.5.	Blutentnahmen und Konservierung der Plasmaproben	43
3.2.3.	Kontrolluntersuchungen	44
3.2.3.1.	Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma	44
3.2.3.2.	Bestimmung des elektrischen Widerstandes in der Vaginalschleimhaut	44
3.3.	Hormonanalytik	45
3.3.1.	Bestimmung der Steroidhormone	45

3.3.1.1.	Bestimmung von Progesteron	45
3.3.1.1.1.	Testdurchführung	45
3.3.1.1.2.	Zuverlässigkeit	46
3.3.1.2.	Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$	46
3.3.1.2.1.	Testdurchführung	46
3.3.1.2.2.	Zuverlässigkeit	47
3.3.1.3.	Spezielle Reagenzien und Geräte zur Bestimmung von Progesteron und Estradiol-17 $\beta$	47
3.3.1.4.	Herstellung der Pufferlösungen	50
3.3.1.5.	Herstellung der Kohlesuspension	51
3.3.1.6.	Materialien und Geräte	51
3.3.2.	Radioimmunologische Bestimmung von Luteinisierendem Hormon (LH)	51
3.3.2.1.	Markierung von bovinem LH mit $^{125}\text{I}$	52
3.3.2.1.1.	Vorbereitung zur Markierung	52
3.3.2.1.2.	Durchführung der Markierung mit $^{125}\text{I}$	52
3.3.2.2.	Testdurchführung	53
3.3.2.3.	Auswertung	54
3.3.2.4.	Qualitätskriterien des Tests	54
3.3.2.5.	Substanzen und Materialien zur Markierung	54
3.3.2.6.	Standardsubstanzen, Antisera und unspezifische Zusätze	55
3.3.2.7.	Puffer	56
3.3.2.8.	Materialien und Geräte	56
<b>4.</b>	<b>Auswertung</b>	<b>57</b>
4.1.	Hormone	58
4.1.1.	Luteinisierendes Hormon (LH)	58
4.1.1.1.	Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung	58
4.1.1.2.	Auswertung der Versuchs- und Kontrollphasen	58
4.1.1.3.	Auswertung der Läufigkeiten während der oder unmittelbar im Anschluß an die Versuchsphasen und spontan aufgetretener Läufigkeiten	59
4.1.1.4.	Kastration	60

4.1.2.	Estradiol-17 $\beta$	60
4.1.2.1.	Definition der Verlaufskurve nach einmaliger Injektion von Estradiol-17 $\beta$ (Vorversuche)	60
4.1.2.2.	Definition der Verlaufskurve nach mehrmaliger Injektion von Estradiolbenzoat (Hauptversuche)	60
4.1.2.3.	Definition der Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion während der Kontrollphasen	61
4.1.3.	Progesteron	61
4.2.	Vaginaler Widerstand	62
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
5.1.	Vorversuche: Induzierte Estradiolverlaufskurve	63
5.2.	Hauptversuche	64
5.2.1.	Induzierte Estradiolverlaufskurve	64
5.2.2.	Überblick Versuchs- und Kontrollphasen	65
5.2.3.	Ergebnisse der Untersuchungen zur Freisetzung von LH	66
5.2.3.1.	Verlauf von Luteinisierendem Hormon in den Versuchs- und Kontrollphasen	66
5.2.3.2.	Verlauf von Luteinisierendem Hormon vor und nach der Behandlung bei kastrierten Hündinnen	77
5.2.4.	Ergebnisse der Untersuchungen zum Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen in den Kontrollphasen	81
5.2.5.	Vergleich der Läufigkeiten der Kontrollphasen mit denen während bzw. unmittelbar im Anschluß an eine Versuchsphase	88
5.2.6.	Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen	93
5.2.7.	Vaginaler Widerstand	96
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>99</b>
6.1.	Versuchsdesign und Methodik	99
6.2.	Diskussion der Ergebnisse	102
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>110</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell der hormonellen Interaktion des Hypothalamo-Hypophysen-Gonadensystems unter Berücksichtigung der Besonderheiten beim Hund (Hoffmann 1999)	3
Abb. 2: Neuroendokrine Steuerung der (Reproduktion) beim weiblichen Individuum bis zum Erreichen der Geschlechtsreife	5
Abb. 3: Verlauf der Hormone Estradiol-17 $\beta$ und Progesteron im Zyklus der Hündin (Hoffmann et al. 1999)	17
Abb. 4.: Estradiol-17 $\beta$ Verlauf im Plasma nach Injektion von 4 $\mu$ g Estradiol-17 $\beta$ /kg KGW ( $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$ ; n=7) (0 = Zeitpunkt der Behandlung)	63
Abb. 5: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ Konzentrationen im Plasma nach Injektion von Estradiolbenzoat	64
Abb. 6: Verlaufskurve von Estradiol-17 $\beta$ ( $\bar{x}_g$ ) für die Versuchsphasen (Anöstrus, nach der Kastration und während der Läufigkeit)	65
Abb. 7 Hündin Jeani: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen $V_{A1-2}$ und $V_D$ sowie der Kontrollphasen $K_A$ und $K_D$ (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)	66
Abb. 8 Hündin Sally: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen $V_{A1-3}$ und $V_D$ sowie der Kontrollphasen $K_{A1-2}$ und $K_D$ (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)	67
Abb. 9 Hündin Billi: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen $V_{A1-3}$ und $V_D$ sowie der Kontrollphasen $K_{A1-2}$ und $K_D$ (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)	68
Abb. 10 Hündin Lena: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen $V_{A1-3}$ und $V_D$ sowie der Kontrollphasen $K_{A1-3}$ und $K_D$ (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)	69
Abb. 11 Hündin Pebbels: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen $V_{A1-4}$ und $V_D$ sowie der Kontrollphasen $K_{A1-4}$ und $K_D$ (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)	70
Abb. 12: Graphische Darstellung der Maximalwerte, AUC, Basalwerte, Peak Anzahl und erster Peak nach Behandlungsbeginn ( $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$ ) der Versuchs und Kontrollphasen; — Daten in zweifache Varianzanalyse einbezogen; - - Daten in Trendanalyse einbezogen;	74
Abb. 13: Verlauf des Luteinisierenden Hormons nach der Kastration vor und nach Behandlung mit Estradiolbenzoat (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)	77
Abb. 14: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$ ) von Luteinisierendem Hormon nach Kastration vor und nach der Behandlung mit Estradiolbenzoat (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)	78
Abb. 15: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x}_g \cdot Sf^{\pm 1}$ ) der Parameter AUC, Maximalwert und Basalwert zur Charakterisierung der LH-Freisetzung nach Kastration und Behandlung mit Estradiolbenzoat	79
Abb. 16 Hündin Jeani: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen $K_A$ und $K_D$ (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)	81

Abb. 17 Hündin Sally: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K <sub>A1-2</sub> und K <sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)	82
Abb. 18 Hündin Billi: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K <sub>A1-2</sub> und K <sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)	83
Abb. 19 Hündin Lena: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K <sub>A1-3</sub> und K <sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)	84
Abb. 20 Hündin Pebbels: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K <sub>A1-4</sub> und K <sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)	85
Abb. 21: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x}_g \cdot Sf^{\pm 1}$ ) der Parameter Maximalwert, Basalwert, Peak Anzahl und AUC der Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung während der Kontrollphasen	87
Abb. 22: Verlauf der Hormone Estradiol-17 $\beta$ , Luteinisierendes Hormon und Progesteron bei den regulär auftretenden Läufigkeiten (K-L) (0* = Zeitpunkt des Auftretens der proöstrischen Blutung)	89
Abb. 23: Verlauf der Hormone Estradiol-17 $\beta$ , Luteinisierendes Hormon und Progesteron der letzten Versuchsphase im Anöstrus mit sich anschließender Läufigkeit V <sub>A</sub> -L (0* = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)	90
Abb. 24: Verlauf von Progesteron im Plasma während der Versuchs- und Kontrollphase im Diöstrus (0 = Zeitpunkt der Behandlung)	94
Abb. 25: Vaginaler Widerstand (Ohm) Geometrischer Mittelwert und Streufaktor der einzelnen Versuchsphasen (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)	96
Abb. 26: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x} \cdot SD$ ) der Parameter Maximalwert und AUC der Vaginalspannung während der Versuchsphasen	97

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronologie der erhaltenen Versuchs- und Kontrollphasen	41
Tabelle 2: Radioimmunotest zur Bestimmung von Progesteron: Kreuzreaktionen unterschiedlicher Steroide mit dem Antiserum Gi-P4-IV	49
Tabelle 3: Radioimmunotest zur Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$ : Kreuzreaktion unterschiedlicher Steroide mit dem Antiserum Gi- E2 $\beta$ -Pool Kaninchen I	50
Tabelle 4: Bei den einzelnen Hündinnen erhaltene Versuchs- und Kontrollphasen (siehe auch Tabelle 1 Seite 41)	57
Tabelle 5: Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung während der Versuchsphasen bei den 5 in den Versuch aufgenommenen Hündinnen: Maximalwerte, AUC, Basalwerte, Anzahl der Peaks, erster Peak nach Behandlungsbeginn	72
Tabelle 6: Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung während der Kontrollphasen bei den 5 in den Versuch aufgenommenen Hündinnen: Maximalwerte, AUC, Basalwerte, Anzahl der Peaks, erster Peak nach Behandlungsbeginn	73
Tabelle 7: Charakterisierung der LH Freisetzung während der Versuchsphase nach	

der Kastration und Behandlung mit Estradiolbenzoat: Maximalwert, AUC und Basalwert	79
Tabelle 8: Versuchsphase Kastration: Maximalwert, AUC, Basalwert; Gruppenvergleich mittels gepaartem t-Test; Angabe von p-Werten	80
Tabelle 9: Parameter zur Charakterisierung der Estradiol-17 $\beta$ Freisetzung während der Kontrollphasen: Maximalwert, AUC, Basalwert und Anzahl der Peaks	86
Tabelle 10: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Zeitspanne Beginn Proöstrus bis zur Duldung bzw. bis zum Ansteigen der Progesteronwerte auf >1ng/ml Plasma	91
Tabelle 11: Vergleich Läufigkeiten der Versuchs- und Kontrollphase: Charakterisierung der LH-Sekretion vor und während der LH-Peaks	91
Tabelle 12: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Charakterisierung der Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung während des Proöstrus	92
Tabelle 13: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Charakterisierung der LH-Freisetzung für den Zeitraum -112 bis +52 um das LH-Maximum	92
Tabelle 14: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Auftreten der Ovulation nach dem gemessenen LH-Maximum des präovulatorischen LH-Peaks	93
Tabelle 15: Progesteronsekretion (AUC) nach den Läufigkeiten der Versuchs- und Kontrollphasen (Tag 0 bis 34 nach der Ovulation)	93
Tabelle 16: Progesteronsekretion (AUC) während der Versuchs- und Kontrollphasen im Diöstrus (0 bis 192 Stunden nach der ersten Injektion)	94
Tabelle 17: Länge des Anöstrus während der Versuchs- bzw. Kontrollphase	95
Tabelle 18: Parameter zur Charakterisierung des vaginalen Widerstandes während der Versuchsphasen: Maximalwert und AUC	97
Tabelle 19: Parameter zur Charakterisierung des vaginalen Widerstandes während der Läufigkeiten V <sub>A</sub> -L und K-L: Maximalwert und AUC	98



## **1. Einleitung und Aufgabenstellung**

Die hormonelle Regulation ist ein Modellbeispiel für das Prinzip biologischer Regelkreise. Beim Regelkreisprinzip erfolgt physiologisch eine Istwert-Sollwert-Anpassung.

In der hormonellen Regulation steuern die Hormone ihre eigene Sekretion auf dem Wege der Rückkopplung (Feedback). Dies setzt voraus, daß eine oder mehrere Schaltstellen existieren, die die Konzentrationen registrieren und entsprechend darauf antworten. Diese Schaltzentralen können allerdings wiederum der Beeinflussung anderer regulierend eingreifender Substanzen unterliegen. Bei hoher Konzentration eines Hormons und bei negativer Rückkopplung kommt es zur Hemmung oder Verringerung der Stimulation der Sekretion bzw. Produktion dieses Hormons. Die positive Rückkopplung hat bei steigenden Konzentrationen eines Hormons eine weitere Stimulation der Sekretion zur Folge. Dieser Vorgang ist jedoch nur physiologisch sinnvoll, wenn er physiologisch auch wieder abgebrochen werden kann. Eine positiv rückkoppelnde Wirkung ist physiologischer Bestandteil der Ovulation. Bei diesen Vorgängen ist allerdings auch zu beachten, daß die involvierten Schaltzentralen auch der Beeinflussung anderer, regulierend eingreifender Faktoren unterliegen. Der zur Ovulation führende Regelkreis beinhaltet die Hypothalamo-Hypophysäre-Ovarielle Achse, an der vor allem die endokrin wirksamen Hormone GnRH aus den Neuronen des Hypothalamus, LH und FSH aus den gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens und Estradiol-17 $\beta$  aus den Granulosazellen der Follikel beteiligt sind (Übersicht, Döcke 1994b).

Die endokrine Kontrolle der Phase des Anöstrus bei der als asaisonal und monöstrisch eingestuften Haushündin ist noch weitgehend unklar. Zwar sind Veränderungen in der Östrogenkonzentration und der LH-Freisetzung gegen Ende des Anöstrus beschrieben worden, auch wurden verschiedene Behandlungsschemata den Anöstrus zu beenden mit unterschiedlichem Erfolg angewandt, über den eigentlichen Mechanismus der Terminierung ist aber noch wenig bekannt. Dabei ist zu unterstellen, daß als Schlüsselereignis die Wiederherstellung der positiv-rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  anzusehen ist. Die Überprüfung des positiven Feedbackmechanismus von Estradiol-17 $\beta$  erscheint also ein geeigneter Parameter zu sein, um den Funktionszustand des Hypothalamus-Hypophysen-Gonadensystems zu überprüfen.

Aufgabe und Ziel dieser Arbeit war es, durch exogene Estradiolgaben und die Messung von Luteinisierendem Hormon im peripheren Plasma die Antwortbereitschaft des Hypothalamus auf die positiv-rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  bei der anöstrischen Hündin zu verifizieren und parallel dazu den Verlauf der endogenen Estradiolsekretion zu erfassen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Die rückkoppelnde Wirkung von Östrogenen**

#### **2.1.1. Allgemeines**

Nach derzeitigem Kenntnisstand ergibt sich speziesübergreifend für den Hund das in Abb. 1 gezeigte Schema der neuroendokrinen Regulation der Sexualfunktion, wobei auf die beim Hund bestehenden Besonderheiten in Kapitel 2.3 eingegangen wird.

Bereits 1932 beschrieb Hohlweg den zuerst hemmenden (negativ rückkoppelnden) und den sich anschließenden fördernden (positiv rückkoppelnden) Effekt von Keimdrüsenhormonen (Estradiol-17 $\beta$ ) auf die hormonelle Sekretion des Hypophysenvorderlappens (Freisetzung von LH) unter Zwischenschaltung des Zentralnervensystems (Hypothalamus). Aufgrund dessen wird diese positive Rückkopplung in der deutschsprachigen Literatur auch *Hohlweg-Effekt* genannt. Als anatomische Schaltstellen sind daran beteiligt: der Hypophysenvorderlappen als Ort der LH-Synthese und –Sekretion, die übergeordneten Neurone des Hypothalamus als Synthese- und Sekretionsort von GnRH, sowie vor allem die Estradiol-17 $\beta$  sezernierenden Granulosazellen der reifenden Follikel. Hypothalamus und Hypophyse sind durch den Hypophysenstiel und den in ihm lokalisierten Portalkreislauf verbunden und werden als Hypothalamo–Hypophysäre Einheit bezeichnet. Der Einfluß von Estradiol auf beide Gehirnbereiche verursacht den zur Ovulation führenden LH-Peak (Krey et al. 1975).

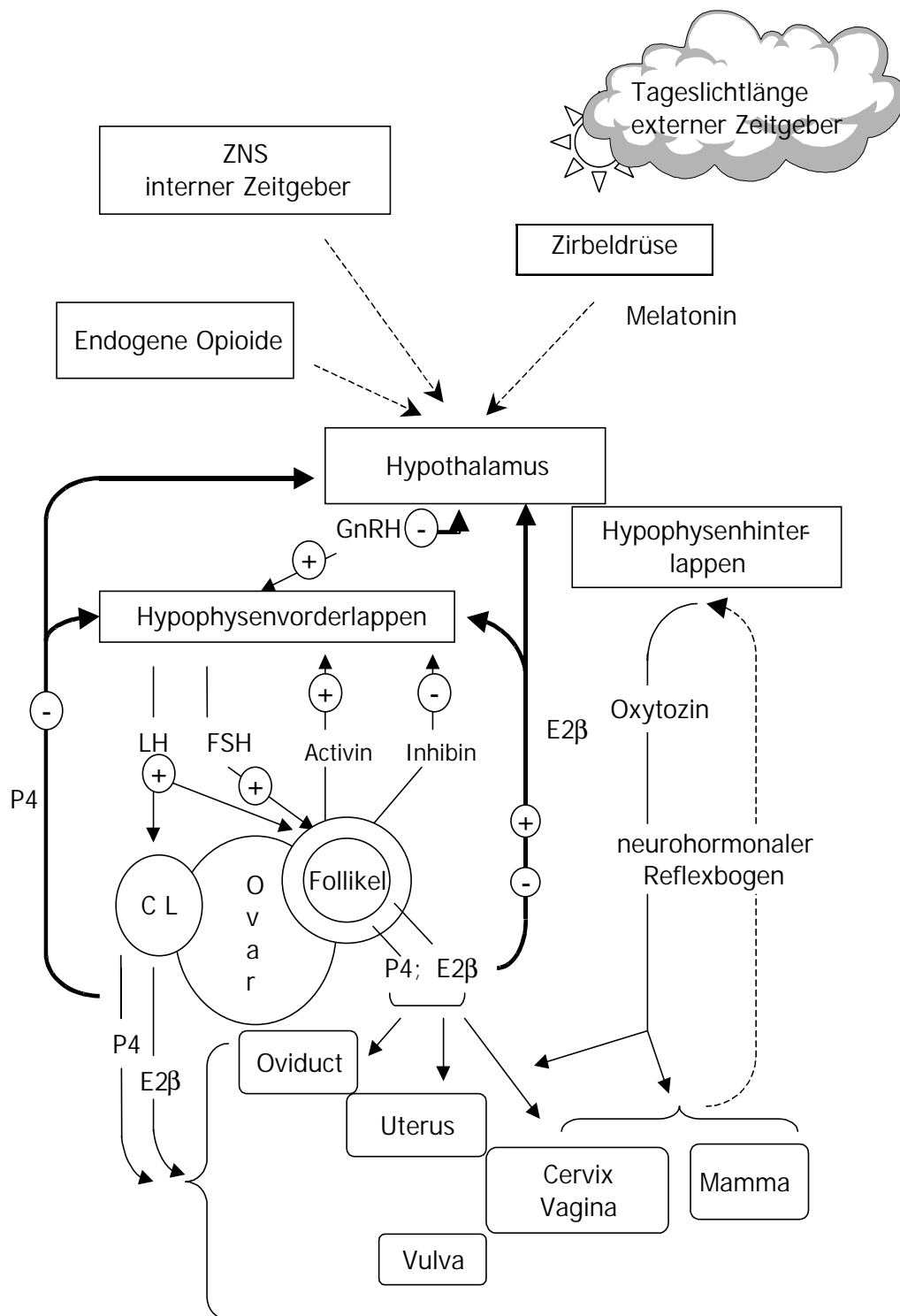


Abb. 1: Modell der hormonellen Interaktion des Hypothalamo-Hypophysen-Gonadensystems unter Berücksichtigung der Besonderheiten beim Hund (Hoffmann 1999)

### **2.1.2. Ontogenetische Entwicklung der positiv rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$**

Die positiv rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  kommt unter physiologischen Umständen bei männlichen Individuen nicht vor, da Androgene, die während der sexuellen Differenzierungsphase nicht in Östrogene umgewandelt werden, für die Organisation des geschlechtsspezifischen männlichen Rollenverhaltens verantwortlich sind (Dörner et al. 1987).

Die kritische Periode der sexuellen endokrinen Differenzierung findet bei der Ratte in den ersten Stunden bis zu 10 Tagen post partum und beim Schwein vor dem 90sten Tag der Gravidität statt, wie durch Verabreichung von androgen-wirksamen Substanzen gezeigt werden konnte. Bei weiblichen Tieren, die in diesem Entwicklungsstadium unter Androgeneinfluß geraten, ist der positive Feedbackmechanismus von Estradiol-17 $\beta$  später beeinträchtigt (Elsaesser und Parvizi 1979, Foxcroft et al. 1984, Corbier 1985, Lira et al. 1986). Angaben über die Situation beim Hund wurden nicht gefunden.

Die positiv rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$ , die zur Freisetzung des prä-ovulatorischen LH-Gipfels führt, ist ein für die Ovulation und damit für die Zyklizität notwendiger Vorgang und somit eine typisch weibliche Wirkung der Östrogene, die sich im Verlauf der Geschlechtsreife bis zur ersten Ovulation und damit dem Einsetzen des ersten Zyklus entwickelt.

In Abb. 2 ist vereinfacht die neuroendokrine Regulation der Fortpflanzung bis zum Erreichen der Geschlechtsreife dargestellt. In dieser Phase wirkt das in nur geringen Mengen produzierte endogene Estradiol-17 $\beta$  vor allem negativ rückkoppelnd.



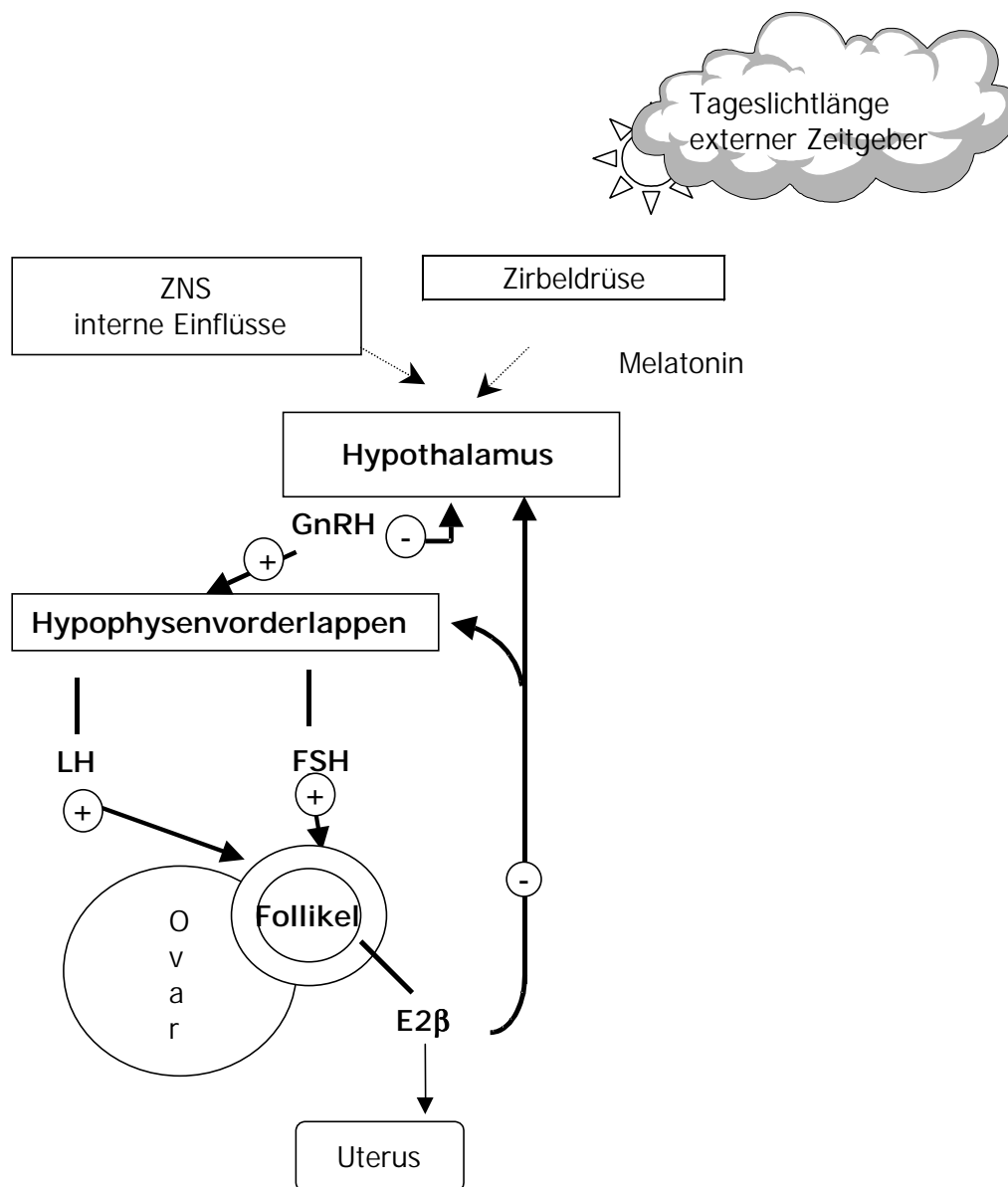


Abb. 2: Neuroendokrine Steuerung der (Reproduktion) beim weiblichen Individuum bis zum Erreichen der Geschlechtsreife

Die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  reift bereits in der fetalen Entwicklung, wie für das Lamm (zwischen 90 und 105 Tag der Gravidität) und das Schwein gezeigt werden konnte (Gluckman et al. 1983). Die Ausprägung des negativen Feedback führt jedoch nicht zum Stillstand der gonadalen Entwicklung. Es werden vielmehr weiterhin ausreichend ovarielle Steroide synthetisiert und ausgeschüttet, wodurch z.B. das präpubertäre Wachstum des Uterus bewirkt wird. Als Östrogenquelle sind die ovariellen Follikel anzusehen (aus Hoffmann 1999), für die beim Kalb ab dem Alter von zwei Wochen ein kontinuierliches, in Wellen ablaufendes Follikelwachstum bis hin zum Tertiärfollikel beobachtet wurde (Evans et al. 1994a).

Mit Beginn der Pubertät ist ein deutlicher Anstieg der Sekretion der gonadotropen Hormone - vor allem von LH - festzustellen, der sich bis zur ersten Ovulation fortsetzt. Von Hohlweg (1932) wurde dieser Vorgang mit der Abnahme der Sensitivität eines Sexualzentrums (Hypothalamus) auf die negativ rückkoppelnde Wirkung der gonadalen Steroide begründet, woraus der Begriff „Desensibilisierung“ abgeleitet wurde.

Day et al. (1987) führten aus Untersuchungen beim Rind diesen Vorgang der Desensibilisierung auf eine Abnahme der Konzentration von Bindungsstellen für Estradiol am Hypothalamus und/oder der Hypophyse zurück. Die damit verbundene vermehrte Verfügbarkeit von LH wird durch eine Erhöhung der LH-Pulsfrequenz und bedingt auch durch eine Erhöhung der Pulsamplitude verursacht (Meijs-Roelofs et al. 1983, Huffman et al. 1987, Dodson et al. 1988).

Bereits 12 Wochen vor der ersten Ovulation reagiert das Hypothalamus-Hypophysensystem von Schafen auf die positiv rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  ebenso sensibel wie das ausgewachsener Tiere (Foster 1984, Meikle et al. 1998). Auch bei präpubertären Färsen (Alter: 28 Wochen) reagierte die Hypothalamo-Hypophysäre Achse bereits positiv auf Estradiol-17 $\beta$  (Swanson und McCarthy 1986), ohne daß allerdings eine Ovulation erfolgte (Foster und Karsch 1975). Auf Grund dieser Beobachtung wird daher eher eine unzureichende ovarielle Steroidhormonbiosynthese als eine verminderte Sensitivität des Hypothalamus auf die rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  für die letzte Phase des anovulatorischen Zustandes vor Erreichen der Geschlechtsreife verantwortlich gemacht (Foster und Karsch 1975, Foster 1984). Dies gilt allerdings nicht für alle Spezies, da beim Meerschweinchen erst ab dem Zeitraum, in dem normaler-

weise die erste Ovulation erwartet wird, mit Estradiol-17 $\beta$  eine LH-Freisetzung stimuliert werden kann. Diese Einrichtung der positiven Rückkopplung zwischen dem 30sten und 46sten Lebenstag ist mit einem Anstieg der Kapazität der Hypothalamo-Hypophysären Achse zur LH-Freisetzung, verbunden (Nass et al. 1984).

Das Einsetzen der Pubertät unterliegt vielfältigen Einflußfaktoren zu denen unter anderem der Ernährungszustand, saisonale Faktoren und soziale Strukturen gezählt werden, aber auch eine endokrine Beeinflussung durch extrahypothalamische Bereiche zu denen z.B. die endogenen Opioide gehören können.

Ein Vergleich mit den endokrinen Veränderungen beim Übergang vom Anöstrus in die Zuchtsaison wird im Kapitel 2.3.2.4 vorgenommen.

Eine Wirkung endogener Opioide auf die LH-Sekretion während der präpubertären Phase beim Schwein konnte Barb et al. (1988) nicht nachweisen.

### **2.1.3. Interaktion endogener Opioide mit der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse**

Von den vielen endogenen Opioidpeptiden, die bisher beschrieben wurden, sollen hier nur diejenigen erwähnt werden, bei denen Hinweise bestehen, daß sie an der Regulation der positiv rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  und der Terminierung des Anöstrus beteiligt sind.

Endogene Opioide sind Peptidhormone. Durch den Nachweis der Expression der mRNA für die Präkursoren Prä-Proopiomelanocortin und Prä-Proenkephalin A und B konnten weite Bereiche des ZNS, Kerngebiete des Hypothalamus und in mit diesem Bereich in Kontakt stehende Neuronen sowie die Hypophyse und die Gonaden als opioidproduzierende Gewebe identifiziert werden (Douglass et al. 1987, Harlan et al. 1987, Hammer et al 1994, Hurt 1996, Mann et al. 1997, Merchenthaler et al 1997). Im Hypothalamus, vor allem im ventromediale Nucleus und im Nucleus arcuatus, stimuliert Estradiol-17 $\beta$  die mRNA Expression (Priest et al. 1995). Durch Spaltung von Prä-Proopiomelanocortin entsteht neben anderen hormonell aktiven Substanzen  $\beta$ -Endorphin und aus Prä-Proenkephalin entstehen die verschiedenen Enkephaline.

Die Rezeptoren für Opioide sind die sogenannten  $\mu$  (mü),  $\kappa$  (kappa) und  $\delta$  (delta) – Rezeptoren. An den  $\mu$ -Rezeptoren bindet auch der Opioidantagonist Naloxon (Parvizi 1994). Opioidrezeptoren finden sich in zahlreichen Geweben, wie z.B. dem Intestinaltrakt (De Luca und Coupar 1996), dem Herzmuskel (Wong et al. 1995), dem Uterus und der Plazenta (Zhu und Pintar 1998), den Granulosazellen der Follikel, den Lutealzellen der Corpora Lutea (Hamada et al. 1995), im präoptischen Bereich, im mediobasalen Hypothalamus (Shen et al. 1995), im Corpus striatum (Martini et al. 1989), im Hippocampus und im Thalamus (Weiland und Wise 1990).

Die lokale Konzentration endogener Opioide in den verschiedenen Gehirnregionen unterliegt unter anderem der Beeinflussung steroidaler Hormone. Estradiol-17 $\beta$  steigert bei weiblichen Ratten die  $\beta$ -Endorphinkonzentrationen in der Hypophyse während Androgene zu einer Senkung der Konzentrationen führen. Daraus wurde gefolgert, daß  $\beta$ -Endorphin das Ziel von gonadalen Feedback Signalen ist (Genazzani et al. 1990).

Beim Hund konnte bisher im Hypophysenvorderlappen ausschließlich  $\beta$ -Endorphin nachgewiesen werden, im Zwischenlappen der Hypophyse finden sich beträchtliche Mengen von N-acetyliertem und C-Terminal verkürzten Formen von  $\beta$ -Endorphin (Young und Kemppainen 1994).

Ebenso wie die Opioidkonzentrationen unterliegen auch Konzentration und Affinität von Opioidrezeptoren steroidalen Wirkungen. Progesteron senkt den Gehalt an  $\mu$ -Rezeptoren im präoptischen Bereich des Schafes ohne dabei die Affinität zu ändern. Im mediobasalen Hypothalamus senkt Progesteron - ebenso wie Estradiol-17 $\beta$  - die Affinität der  $\delta$ -Rezeptoren bei gleichzeitiger Steigerung der Bindungskapazität (Shen et al. 1995). Weiter konnte beim Schaf gezeigt werden, daß sich während des Zyklus das Verhältnis der  $\delta$ - zu den  $\mu$ -Rezeptoren verändert, ohne daß sich dabei die Gesamtzahl der Opioidrezeptoren verändert; so ist das Verhältnis  $\delta : \mu$  Rezeptoren im präoptischen Bereich am höchsten in der Lutealphase. Im mediobasalen Hypothalamus steigt während der Follikelphase sowohl die Zahl der  $\delta$ - als auch der  $\mu$ - Rezeptor-Subtypen.  $\kappa$ -Rezeptoren sind unbeeinflusst vom Zyklusstadium und von Steroidhormongaben (Thom et al. 1996). Ebenso wie beim Schaf verstärkt Estradiol-17 $\beta$  auch bei der Ratte die durch Progesteron hervorgerufene Absenkung der  $\mu$ -Rezeptoren im Hypothalamus und im Corpus striatum, wie anhand der Abnahme der Bindungsstellen für Naloxon ge-

zeigt werden konnte (Martini et al. 1989). Die Autoren schlossen daraus, daß die hypothalamischen  $\mu$ -Rezeptoren an der positiv-rückkoppelnden und nicht an der negativ-rückkoppelnden Regulation der LH-Sekretion beteiligt sind.

Neuere Untersuchungen beim Schaf zeigen, daß ein direkter hemmender Einfluß der Opioide durch die Aktivierung der  $\mu$ -Rezeptoren (nicht der  $\delta$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren) auf die GnRH-Sekretion zu beobachten ist, die soweit geht, daß die durch Estradiol-17 $\beta$  induzierte GnRH/LH Freisetzung gehemmt wird, gleichzeitig ist eine Steigerung der Prolaktinsekretion festzustellen. Dies setzt allerdings voraus, daß eine ausreichende Konzentration der Opioide in den entsprechenden Gehirnregionen erreicht wird (Walsh und Clarke 1996). Beim Schwein und Affen hemmen Opioide die tonische und pulsatile Gonadotropinsekretion, vor allem während der Luteal- und späten Follikelphase, wahrscheinlich durch Wirkung an suprahypophysärer Stelle in der medianen Eminenz des Hypophysenstils. Die Wirkung ist durch Naloxon aufzuheben, ebenso wie Naloxon die GnRH-Freisetzung aus dieser Region nach priming mit Estradiol-17 $\beta$  erhöht (Ferin et al. 1982, Brooks et al. 1986b, Horton et al. 1989, Okrasa et al. 1992). Wird Morphin über einen längeren Zeitraum verabreicht (4 Tage) verstärkt sich die negative und die sich anschließende positive rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  auf die LH-Sekretion bei Ratten und verlegt den Zeitpunkt des Beginns der provozierten LH-Freisetzung vor. Aus diesen Untersuchungsergebnissen schlossen Gabriel et al. (1987), daß dem opioden System eine bedeutende stimulierende Rolle beim Wechsel der Estradiol-17 $\beta$  Wirkung vom negativen zum positiven Feedback zukommt. Auch Walsh und Clarke (1998) schlossen aus ihren Untersuchungen beim Schaf über die Lokalisation opioider Wirkungen auf die GnRH-Ausschüttung, daß die Aufhebung der Hemmung der an die  $\mu$ -Rezeptoren bindende Opioide direkt für den präovulatorischen GnRH/LH Peak verantwortlich ist.

Opioide, vor allem  $\beta$ -Endorphin, stehen in direktem Zusammenhang mit dem Laktationsanöstrus. Unmittelbar nach der Geburt steigt die LH-Sekretion zwar an, wird dann aber durch zentral im Hypothalamus wirkende Opioide während der Laktation gehemmt (Quesnel und Prunier 1995). Hypothalamisches  $\beta$ -Endorphin, beim Schaf und Schwein auf den Stimulus des Säugens ausgeschüttet, reduziert die GnRH-Freisetzung und folgend die hypophysäre Gonadotropinsekretion (Barb et al. 1986, Gordon et al. 1987);

so zeigt sich nach Anwendung des Opioidantagonisten Naloxon während der Laktation eine Erhöhung der LH-Sekretion (Barb et al. 1986).

Neben der Beteiligung an der Regulation des Laktationsanöstrus sind endogene Opiode auch an der Regulation der saisonalen Fortpflanzung beim Pferd beteiligt. Im letzten Teil der anovulatorischen Saison ist eine tonische opioid bedingte Hemmung der LH-Freisetzung bei Stuten vorhanden (Aurich et al. 1994). Beim Schaf hingegen ist es nicht möglich während des saisonalen Anöstrus die positiv rückkoppelnde Wirkung von Estradiol mit Opioiden oder Opioidantagonisten zu beeinflussen (Horton und Clarke 1988). Die steigende negative Feedback-Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  im Anöstrus der Schafe wird nicht über Opiode vermittelt (Brooks et al. 1986a).

#### **2.1.4. Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) - Hormon des Hypothalamus**

##### **2.1.4.1. Herkunft**

Die Beobachtung, daß ein sehr gut ausgeprägtes Gefäßsystem zwischen Hypothalamus und Hypophyse existiert, führte zu der Annahme, daß die Signalübermittlung zwischen Hypothalamus und Hypophyse über neurohumorale Wege erfolgt. Aus der Tatsache, daß die gonadale Funktion bei hypophysektomierten Tieren (Ratten) erhalten bleibt, wenn Anteile der Hypophyse in die hypophysären Portalgefäße transplantiert werden, ließen den funktionellen Zusammenhang zwischen Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden erkennen. (aus Fink 1988).

1965 berichteten Endröczy und Hilliard, daß Extrakte aus der medianen Eminenz des hinteren Hypothalamus, der mesencephalen reticulären Formation und der zentralen grauen Substanz, dem vorderen Hypothalamus und dem amygdaloiden Komplex des Kaninchen- und Hundehirns die Sekretion von LH steigern. Yamashita zeigte 1966 bei Untersuchungen am Rüden, daß die Sekretion der 17-Ketosteroide in der V. testicularis nach parenteraler Verabreichung von Extrakten der medianen Eminenz des Hypophysenstils stimuliert werden kann. Dies ist nach der Entfernung der Hypophyse nicht mehr möglich. Der Autor schloß daraus, daß die Wirkung dieser Extrakte auf die Gonaden von dem Vorhandensein der Hypophyse abhängig ist.

Als der dieser Regulation zugrunde liegende Wirkstoff wurde GnRH (Synonym für

LH-RH = Luteinising Hormone Releasing Hormone oder LH-RF (Luteinising Hormone Releasing Factor) identifiziert. Bei GnRH handelt es sich um ein Dekapeptid aus dem Hypothalamus mit einer bei Säugetieren einheitlichen Aminosäuresequenz [(pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>] wie sie erstmals von Schally et al. (1971a) beim Schwein und später von anderen Autoren bei anderen Tierarten beschrieben wurde (Amoss et al. 1971, Schally et al. 1971b, Guillemin und Burgus 1972, Burgus et al. 1972).

#### **2.1.4.2. Sekretion**

Die Sekretion von GnRH erfolgt nicht kontinuierlich sondern in Pulsen, die gekennzeichnet sind durch Dauer, Amplitude und Frequenz. Die Messung der GnRH - Sekretion erfolgte bisher entweder direkt im Portalvenenblut oder in der Cerebrospinalflüssigkeit oder indirekt über die Wirkung auf das Hypophysen - Gonadensystem durch Messung der Hormone LH, Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron, wobei in diesen Fällen aus dem Sekretionsmuster dieser Hormone Rückschlüsse auf die GnRH - Sekretion gezogen wurden.

Für die Wirkung von GnRH, insbesondere im Hinblick auf den durch Estradiol-17 $\beta$  ausgelösten LH-Peak, ist vor allem die Pulsfrequenz und nicht so sehr die Pulsamplitude von Bedeutung. Die basale LH-Sekretion ist bei Verdoppelung der GnRH-Pulsfrequenz deutlich erhöht, wie Versuche an Schafen mit durchtrenntem Hypophysenstiel zeigten; eine Verdoppelung der GnRH-Amplitude hatte eine im Vergleich geringere Wirkung (Clarke et al. 1989). Die LH-Pulsamplitude zeigt eine positive Korrelation mit der auslösenden GnRH-Pulsamplitude (Britt et al. 1991, Concannon et al. 1997) und eine negative mit der GnRH-Pulsfrequenz (Clarke und Cummins 1985a).

Die, eine Ovulation auslösende GnRH-Sekretion folgt, wie Untersuchungen beim Schaf (Portalvenenblut), der Ziege (Messung von LH, Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron), dem Affen (Cerebrospinalflüssigkeit), der Frau (Messung von LH, Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron) und dem Rind (Cerebrospinalflüssigkeit) gezeigt haben, einem typischen Signalmuster. Dieses zeigt eine niedrigen Pulsfrequenz während der Lutealphase, die während der Follikelphase bei gleichzeitiger Abnahme der Pulsamplitude ansteigt; ein

deutlicher GnRH-Gipfel zeigt sich unmittelbar vor dem präovulatorischen LH-Peak, wobei direkte quantitative Beziehungen zwischen der freigesetzten Menge GnRH und dem LH-Gipfel bestehen (Reame et al. 1984, Clarke et al. 1987, Clarke et al. 1989, Moenter et al. 1991, Barrell et al. 1992, Xia et al. 1992, Evans et al. 1994b, Clarke 1995, Evans et al. 1995a, Tanaka et al. 1995, Gazal et al. 1998). Allerdings wurde in Versuchen bei hypophysektomierten Schafen gezeigt, daß auch eine erhöhte basale GnRH-Ausschüttung die für den LH-Peak wichtige pulsatile GnRH-Sekretion weitgehend ersetzen kann (Phillips et al. 1990).

Der LH-Peak endet, obwohl die GnRH- Sekretion noch nicht wieder auf Basalniveau abgefallen ist. (Reame et al. 1984, Clarke et al. 1987, Clarke et al. 1989, Moenter et al. 1990, Moenter et al. 1991, Barrell et al. 1992, Xia et al. 1992, Clarke 1995, Tanaka et al. 1995). Eine Unterbrechung der GnRH-Zufuhr während des präovulatorischen LH-Peaks führt zum Absinken der LH-Konzentration im Plasma auf Basalniveau (Evans et al. 1996).

Die GnRH-Sekretion zeigt bei vielen Spezies saisonale Unterschiede. So ist die GnRH-Pulsfrequenz beim Schaf im Anöstrus niedriger als während der Decksaison (Clarke 1988, Barrell et al. 1992). Ähnliche Veränderungen sind beim Hund am Ende des Anöstrus zu messen. Im späten Anöstrus und im späten Proöstrus werden signifikant höhere Mengen ausgeschüttet, als zu den übrigen Zyklusstadien. Da die freigesetzte GnRH-Menge positiv mit den gemessenen LH-Konzentrationen im Plasma korreliert, schlossen Tani et al. (1996), daß die freigesetzte GnRH-Menge während des Anöstrus des Hundes steigt und die Hypophyse fähig ist, mit entsprechenden LH-Sekretionen zu reagieren.

Untersuchungen bei der Stute zeigten keine Veränderung der Konzentrationen von GnRH im Hypothalamus sowie des GnRH-Rezeptorgehaltes der Hypophyse vom Anöstrus bis zur Zuchtsaison; trotzdem steigt die Sensitivität der gonadotropen Zellen auf GnRH gegen Ende des Anöstrus an. Dieses ist eventuell durch die erhöhte Sensitivität der dem Rezeptor nachgeschalteten Vorgänge bedingt (Silvia et al. 1986, Silvia et al. 1987).



GnRH kann über einen „short“ oder “ultrashort loop negative Feedback” die eigene Sekretion hemmen, d.h GnRH reguliert über diesen Mechanismus seine Konzentrationen im Portalvenenkreislauf und damit auch die LH-Sekretion aus der Hypophyse, wie Untersuchungen an Schafen unter Verwendung eines GnRH-Antagonisten gezeigt haben. Infolge der Gabe des Antagonisten erhöhte sich die Frequenz, die Amplitude und die basale Konzentration der GnRH-Ausschüttung (Padmanabhan et al. 1995).

#### **2.1.4.3. Bindung und Wirkung an der Hypophyse**

GnRH bindet an spezifische membranständige GnRH-Rezeptoren des Hypophysenvorderlappens. Die GnRH-Rezeptorkonzentration in den gonadotropen Zellen wird von GnRH, wenn in physiologischen Mustern ausgeschüttet, und von Estradiol-17 $\beta$  gesteuert. GnRH hat im Gegensatz zu Estradiol-17 $\beta$  keinen Einfluß auf die Expression des GnRH Rezeptor Gens, wie der Nachweis von GnRH-Rezeptor mRNA unter Einfluß von Estradiol-17 $\beta$  und GnRH beim Schaf gezeigt haben (Clarke et al. 1988, Turzillo et al. 1995). Nach Bindung an seinem Rezeptor reguliert GnRH die Genexpression der FSH- und LH $\beta$ -Untereinheit und der gemeinsamen  $\alpha$ -Untereinheit (Hamernik und Nett 1988, Mercer et al. 1988) und ist somit für die LH- und FSH-Konzentrationen in der Hypophyse verantwortlich. GnRH fördert demzufolge auch gleichzeitig die Sekretion von LH und FSH (Adams und Adams 1986, Garza et al. 1986, Porter et al. 1997). Infolge dessen führt aktive Immunisierung gegen GnRH zum Ausbleiben jeglicher zyklischer Aktivität, wie Untersuchungen am Schwein, Rind, Schaf und der Stute gezeigt haben (Esbenshade und Britt 1985, Garza et al. 1986, Bishop et al. 1996, Brown et al. 1995).

#### **2.1.5. Gonadotropine**

##### **2.1.5.1. Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH)**

LH und FSH sind Glykoproteine die in der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) gebildet werden. Beide Hormone bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird von nur einem Gen codiert und ist ab der fetalen Periode im Hypophysenvorderlappen ständig in höheren Konzentrationen vorhanden. Die  $\beta$ -Untereinheiten bilden den hormonspezifischen Anteil von LH und FSH, ebenso wie die der  $\alpha$ -Untereinheit angelagerten Kohlehydrate (Döcke 1994c).

Die LH- und FSH-Produktion ist in der Pars distalis und der Pars tuberalis der Hypophyse lokalisiert, wobei beim Hund die Anzahl der LH produzierenden Zellen um 1,5 % höher ist als die der FSH produzierenden. Auch scheint es Zellen zu geben, die sowohl LH als auch FSH produzieren. Die Anzahl der gonadotropen Zellen in der Pars distalis ist bei erwachsenen männlichen Hunden niedriger als bei weiblichen Tieren im Anöstrus (El-Etreby und Fath-El-Bab 1977). Im Zusammenhang mit dem präovulatorischen LH-Peak des Hundes fallen die hypophysären LH-Konzentrationen steil vom Proöstrus zum Tag 2 des Diöstrus ab und werden erst allmählich während des Diöstrus wieder aufgefüllt (Fernandes et al. 1987).

LH hemmt indirekt durch Unterdrückung der GnRH-Sekretion auf der Ebene des Hypothalamus oder höherer Zentren die eigene Sekretion: dies konnte durch Gabe von humanem Choriongonadotropin (hCG), ein vom Chorion der menschlichen Plazenta produziertes Gonadotropin mit LH-Wirkung, an Sauen gezeigt werden. hCG hemmt den durch Estradiol-17 $\beta$  induzierten LH-Peak; dieser Vorgang kann durch GnRH-Gaben aufgehoben werden (Ziecik et al. 1988).

LH wird, wie bei anderen Säugetierarten (Rind, Schwein, und Pferd), auch beim Rüden und der Hündin während der einzelnen Zyklusphasen pulsatil ausgeschüttet (Jeffcoate 1993; Günzel Apel 1994; Hoffmann et al. 1996). Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der LH-Pulsamplitude und der Menge des freigesetzten LH's aus der Hypophyse (Clarke und Cummins 1985a, Clarke et al. 1987).

Die Änderung der LH-Pulsfrequenz ist ein wichtiger Faktor bei der Wiederaufnahme zyklischer Aktivität nach der Anöstrusphase, wie Untersuchungen unter anderem bei azyklischen Rindern gezeigt haben. Es muß eine minimale Schwelle der endogenen LH-Pulsfrequenz überschritten werden, damit Estradiol-17 $\beta$  seine stimulierende positiv rückkoppelnde Wirkung entfalten kann (Schallenberger et al. 1985a).

So ist auch das Sekretionsmuster von LH während des Anöstrus des Hundes nicht konstant. Die LH-Pulsfrequenz, gemessen während hochfrequenter Blutentnahme zu definierten Zeitpunkten des Anöstrus, steigt ebenso wie die LH-Ausschüttung, dargestellt durch die Area Under Curve (AUC), im Verlaufe des Anöstrus (Hoffmann et al. 1996, Riesenbeck 1997).

LH kann, von außen zugeführt, den Anöstrus der Hündin beenden und einen fertilen Östrus auslösen. Der Anöstrus der Hündin scheint nach Untersuchungsergebnissen von Verstegen et al. (1997) unter anderem auf eine unzureichende LH-Sekretion zurückzuführen zu sein. Hoffmann et al. (1996) und Riesenbeck (1997) konnten allerdings zeigen, daß - individuell unterschiedlich - die LH-Sekretion schon ab Mitte des Anöstrus ansteigen kann und daß dieser Zustand bis zum Ende des Anöstrus gehalten wird.

LH und FSH stimulieren die Steroidbiosynthese in den Zellkompartimenten der Follikel. LH kontrolliert über die Aktivierung der cytochrom P450 side-chain-cleavage (P450 scc) die De-novo-synthese von Pregnenolon und damit von Progesteron in den Theka- und Granulosazellen aus Cholesterol, sowie - beschränkt auf die Thekazellen - über die 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C17,20-Lyase die Synthese von Androgenen (Androstendion). FSH fördert über die Aktivierung der P450-Aromatase vor allem die Synthese von Estradiol-17 $\beta$  und über die Regulierung der Verfügbarkeit von P450-scc die prä-ovulatorische Synthese von Pregnenolon und Progesteron in den Granulosazellen. FSH stimuliert nachweislich das Follikelwachstum ab dem Stadium des Tertiärfollikels (aus Hoffmann 1999).

Die pulsatile LH-Sekretion vor dem präovulatorischen LH-Peak fördert die Reifung des antralen Follikels bis zum sprungreifen Follikel (McNatty et al. 1981). Der präovulatorische LH-Anstieg ist der ovulationsauslösende Faktor im Zyklus. Zeitlich erfolgt die Ovulation tierartspezifisch vor Erreichen von LH-Maximalwerten (Pferd) unmittelbar danach (Wiederkäuer) oder, wie beim Hund, erst 2 Tage später.

#### **2.1.5.1. Prolaktin**

Prolaktin (synonym laktotropes-, luteotropes Hormon) ist ein Proteohormon mit einer tierartspezifischen Anzahl von Aminosäuren, z.B. 199 beim Schwein und 198 bei Wiederkäuern. Die Synthese findet vor allem in den laktotropen Zellen der Pars distalis des Hypophysenvorderlappens statt. Östrogene, Ca<sup>++</sup>-Ionen, TRH (Thyrotropin releasing Hormone) und cAMP fördern und Dopamin hemmt die Expression des Prolaktin codierenden Gens (aus Döcke 1994a).

Die Wirkungen von Prolaktin sind vielfältig. Vor allem bei Nagetieren, aber auch bei

Schwein und Schaf, wirkt Prolaktin - abhängig von der Lutealphase - luteotrop (aus Döcke 1994a).

Beim Hund ist Prolaktin - neben LH - vor allem in der zweiten Hälfte der Lutealphase der eigentliche luteotrope Faktor. So führt die Verabreichung eines die Prolaktinsekretion hemmenden Dopaminagonisten zur Absenkung der Progesteronsekretion als Zeichen der lutealen Regression (Okkens und Beves 1990). Onclin und Verstegen (1997a) zeigten, daß dies durch exogene Prolaktinabgaben verhindert werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine direkte Wirkung von Dopamin am Corpus luteum ausgeschlossen werden kann.

Neben der Stimulierung der Laktogenese während der Laktation wird für Prolaktin und das dopaminerge System vor allem auch eine Bedeutung in der Regulation des Anöstrus diskutiert wie in Kap. 2.3.2.4.1 dargelegt wird.

#### **2.1.6. Rolle von Hormonen ovariellen Ursprungs**

Zu den Hormonen ovariellen Ursprungs, die an der Regulation der ovulationsauslösenden LH-Peaks beteiligt sind, gehören Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron.

##### **2.1.6.1. Östrogene**

###### **2.1.6.1.1. Herkunft**

Beim nicht graviden, zyklischen Tier sind die Granulosazellen der Follikel der wichtigste Syntheseort von Estradiol-17 $\beta$ . Die Konzentrationen im peripheren Plasma sind demnach stark von dem jeweiligen Zyklusstand abhängig. Abb. 3 zeigt den Verlauf von Estradiol-17 $\beta$  bei der nichtgraviden Hündin. Daraus geht hervor, daß beim Hund im frühen und mittleren Anöstrus nur sehr niedrige Konzentrationen an Estradiol-17 $\beta$  im Plasma nachzuweisen sind, erst ca. einen Monat vor Beginn des Proöstrus steigt Estradiol-17 $\beta$  an (Jeffcoate 1993, Hoffmann et al. 1996).

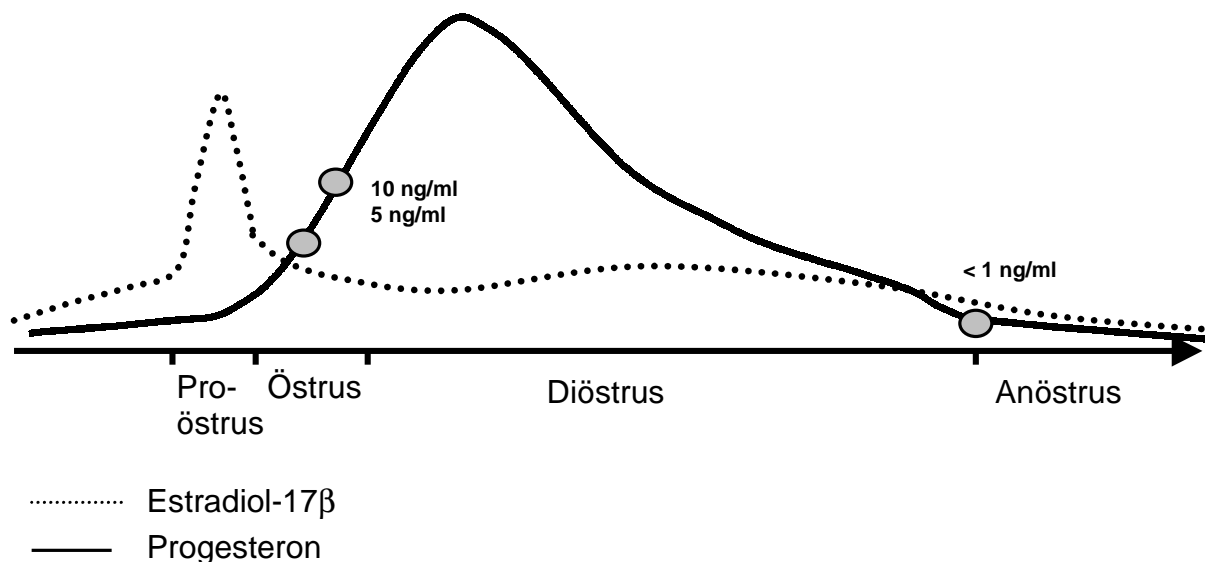


Abb. 3: Verlauf der Hormone Estradiol-17β und Progesteron im Zyklus der Hündin (Hoffmann et al. 1999)

#### 2.1.6.1.2. Wirkungen von Estradiol-17β am Hypothalamus–Hypophysensystem

Estradiol-17β verursacht im zeitlichen Ablauf zuerst eine Hemmung der LH-Sekretion (negatives Feedback), gefolgt von einer Steigerung der LH-Ausschüttung (positives Feedback), die zum die Ovulation auslösenden LH-Peak führt.

Untersuchungen an verschiedenen Bereichen des ZNS haben die medialen präoptischen und ventralen präamillären Kerne des Hypothalamus und die medialen amygdaloiden Kerne des limbischen Systems als Zielorte östrogenen Wirkung identifiziert. Somit sind weitreichende Gehirnregionen an der rückkoppelnden Wirkung beteiligt (Smollich und Döcke 1977). Caraty et al. (1995) grenzten diese Region auf den mediobasalen Hypothalamus ein und differenzierten beim Schaf den ventromedialen Nukleus des Hypothalamus als den Bereich, der für die Auslösung des präovulatorischen GnRH-Peaks verantwortlich ist, und den medialen präoptischen Bereich sowie eventuell den mediobasalen Hypothalamus als Bereiche der negativen Feedback-Wirkung. Caraty et al. (1998) schließen daraus, daß unterschiedliche und eventuell unabhängige neuronale Zellpopulationen für die negative und positive Feedback-Wirkung von Estradiol-17β verantwortlich sind. Petersen und Barraclough (1989) beschreiben bei der Ratte die medialen präoptischen Kerne als Ort der positiven Feedback-Wirkung von Estradiol-17β. Diese Bereiche beeinflussen dann über die pulsatile GnRH-Sekretion die LH-Ausschüttung und nicht direkt über die Hypophyse. Allerdings konnte unter experimentellen

Bedingung und unter der Voraussetzung, daß der Hypophysenvorderlappen durch konstante GnRH-Pulse stimuliert wurde der präovulatorische LH-Peak auch durch direkte Einwirkung von Estradiol-17 $\beta$  auf den Hypophysenvorderlappen ausgelöst werden (Nakai et al. 1978, Wun und Thorneycroft 1987).

#### **2.1.6.1.2.1. Steroidpriming und negativer Feedback**

Die negative Rückkopplung (negatives Feedback) von Estradiol-17 $\beta$  bezeichnet den Vorgang, in dem Estradiol-17 $\beta$  zur meßbaren Hemmung der Ausschüttung der Hormone GnRH und LH führt. Die tierartspezifisch unterschiedlich lang andauernde Hemmung der GnRH- und LH-Ausschüttung ist unerlässlich, um einen vollständigen LH-Peak mit nachfolgender Ovulation auszulösen (Kesner et al. 1989).

In dieser Periode der negativ rückkoppelnden Wirkung findet das sogenannte Priming durch die Steroidhormone Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron statt. Als Priming bezeichnet man die Wirkungen und Veränderungen, die diese Steroide auf das Hypothalamus–Hypophysensystem ausüben. Dabei konnte gezeigt werden, daß das durch Estradiol-17 $\beta$  herbeigeführte „Priming“ deutlich weniger Zeit beansprucht als z.B. der Verlauf der präovulatorischen Estradiolausschüttung (Johnston und Davidson 1979).

Eine dem Priming zugrunde liegende wesentliche Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  ist die Stimulation der Expression der eigenen Rezeptoren in verschiedenen Gehirnbereichen, die Stimulation von GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse, die Förderung der Synthese von GnRH im Hypothalamus und der von LH in der Hypophyse.

Untersuchungen an ovariectomierten Schafen haben gezeigt, daß bereits 1 h nach Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  die Konzentrationen der nukleären Estradiol-17 $\beta$  Rezeptoren in der Hypophyse deutlich angestiegen waren (Clarke et al. 1982). Daß Estradiol-17 $\beta$  diese Bildung seiner eigenen Rezeptoren stimuliert, konnte durch Untersuchungen mit Östrogenantagonisten gezeigt werden, die eine Reduktion der Östrogenrezeptorkonzentrationen in Hypophyse und Hypothalamus bewirkten (Schramm et al. 1991). Weiter wurde bei ovariectomierten Ratten gezeigt, daß Estradiol-17 $\beta$  auch die Konzentrationen nukleärer Estradiol-17 $\beta$  Rezeptoren im präoptischen Bereich und im Hypothalamus auf Werte, wie sie in diesem Bereichen physiologischer Weise im Pro-

östrus gemessen werden, steigert (Krey und Parsons 1982, Döcke et al. 1989). Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  auf die Konzentration der eigenen Rezeptoren ist in den verschiedenen Gehirnbereichen unterschiedlich; so wurde bei der Ratte gezeigt, daß in der Hypophyse wesentlich geringere Estradiol-17 $\beta$  Konzentrationen zu einer Erhöhung der Östrogenrezeptorkonzentration zu führt als im präoptischen Bereich oder im mediobasalen Hypothalamus (Johnston und Davidson 1979).

Untersuchungen beim Schaf haben weiter gezeigt (Clarke et al. 1988), daß während der Phase der negativ rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  die ebenfalls durch Estradiol-17 $\beta$  induzierte Steigerung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse nicht mit einer Erhöhung der Antwortbereitschaft dieses Organs auf GnRH einhergeht. In Übereinstimmung damit ist die Beobachtung, daß beim Schwein Estradiol-17 $\beta$  die Antwort auf GnRH über 6 bis 12 Stunden blockiert, um die Ansammlung von freisetzbarem LH zu steigern. Auch bei der Ratte und beim Schaf kann Estradiol-17 $\beta$  im Proöstrus die durch GnRH ausgelöste LH-Sekretion unterdrücken (Turgeon und Waring 1981, Britt et al. 1991; Clarke 1995). Im Gegensatz dazu ist während der Phase der positiven Rückkopplung unter dem Einfluß von Estradiol-17 $\beta$  eine Steigerung der Antwortbereitschaft der Hypophyse auf GnRH festzustellen (Nagahara et al. 1985).

Während der Phase der negativ rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  moduliert Estradiol-17 $\beta$  die GnRH-mRNA Synthese (Rosie et al. 1990) und führt zur 2,5 fachen (mittlere präoptische Region) bis zur 40 fachen (laterale und dorsale Region des Hypothalamus) Erhöhung der GnRH-Konzentrationen (Kumar et al. 1980).

Bezüglich der Verfügbarkeit von LH konnte beim Schaf gezeigt werden, daß unter physiologischen Bedingungen bis zu 5 Stunden nach Beginn des Östrus ein Anstieg des LH-Gehaltes im Hypophysenvorderlappen meßbar ist; die Expression der LH-mRNA steigt bis zu 25 Stunden nach Östrusbeginn (Landefeld et al. 1985). Unter experimentellen Bedingungen, d.h. Ovariectomie und/oder Durchtrennung des Hypophysenstils zur Ausschaltung ovarieller bzw. hypothalamischer Einflußfaktoren, ergaben sich allerdings nach Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  zum Teil gegenteilige Befunde. So blieb die LH $\beta$ -mRNA Konzentration während der negativ rückkoppelnden Phase bei Schafen

konstant oder es kam nach Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe zum meßbaren Abfall der LH $\beta$ -mRNA Konzentration. Der unter diesen Bedingungen gemessene, sich anschließende LH-Peak, hatte trotz niedriger LH $\beta$ -mRNA Konzentrationen physiologische Dimensionen. Im Falle eines Rückgangs der mRNA für die LH $\beta$ -Untereinheiten zeigte sich, daß dieser durch die Estradiol-17 $\beta$  bedingte Hemmung der GnRH-Sekretion verursacht wird und durch GnRH-Gabe verhindert werden kann. All diese Veränderungen laufen in sehr kurzen Zeiträumen ab (Schallenger et al. 1985b, Karsch et al. 1987, Kesner 1989, Britt et al. 1991, Richardson et al. 1992, Mercer et al. 1993).

Als ein priming Effekt ist auch zu verstehen, daß – wie Thomas und Clarke (1997) beim Schaf zeigen konnten – Estradiol-17 $\beta$  in den gonadotropen Zellen der Hypophyse eine Verschiebung der LH enthaltenden Granula zur Plasmamembran induziert; dabei ist die Verteilung der LH-Granula nicht polarisiert, sondern sie sind gleichmäßig in der Peripherie zu finden. Die Granula, die FSH enthalten, wandern nicht unter Estradiol-17 $\beta$  Einfluß.

#### **2.1.6.1.2.2. Positiver Feedback**

Der LH-Peak ist nicht auf die Abschwächung des negativen Feedbacks von Estradiol-17 $\beta$  auf einen die LH-Sekretion beeinflussenden hypothalamischen Pulsgenerator zurückzuführen, sondern das Ergebnis einer positiven Feedback-Stimulation eines spezifischen Generators (Kraeling et al. 1998).

So verhindert passive Immunisierung gegen Estradiol-17 $\beta$  den positiven Feedback auf die LH-Sekretion, ohne dabei die LH-Basalkonzentrationen zu verändern (Kaneko et al. 1995). Der Anstieg der Estradiol-17 $\beta$  Sekretion in der späten Follikelphase löst einen plötzlichen GnRH-Peak aus, der zeitgleich oder unmittelbar vor dem präovulatorischen LH-Peak auftritt. Der durch Estradiol-17 $\beta$  ausgelöste GnRH-Peak ist mit einer Erhöhung der GnRH-Pulsamplitude und einer Steigerung der GnRH-Sekretion in den Interpulsintervallen verbunden (Clarke und Cummins 1985b; Moenter et al. 1990, Britt et al. 1991, Clarke 1993; aus Caraty et al. 1995). Neuere, auf hochfrequenten Blutentnahmen ( $\leq 2$  Minuten) basierende Untersuchungen am Schaf weisen allerdings darauf hin, daß der eigentliche GnRH-Peak eine kontinuierliche Sekretion zeigt, so daß Estradiol-17 $\beta$  die episodische GnRH-Sekretion in eine kontinuierliche umzuschalten scheint (Moenter



et al. 1992; Evans et al. 1995b).

Untersuchungen zur Regulation dieser Erhöhten GnRH-Freisetzung durch Estradiol-17 $\beta$  weisen auf eine Modulation an den Neuronen des Hypothalamus hin. Estradiol-17 $\beta$  beeinflusst die Konzentrationen des auf die GnRH-Sekretion hemmend wirkenden Neurotransmitters  $\gamma$  Aminobuttersäure (GABA) sowie die Konzentrationen der auf die GnRH-Sekretion stimulierend wirkenden und hier als Neurotransmitter dienenden Aminosäuren Aspartat und Glutamat; vor und während der Zeit des durch Estradiol-17 $\beta$  induzierten LH-Peaks ist ein deutlicher Abfall der präoptischen GABA-Freisetzung von einer erhöhten präoptischen Sekretion von Aspartat und Glutamat begleitet (Jarry et al. 1991; Jarry et al. 1992). Meßbare Veränderungen in der Sekretion dieser Neurotransmitter sind nur im präoptischen hypothalamischen Bereich unmittelbar vor und während des LH-Peaks festzustellen, so daß Jarry et al. (1995) schlossen, daß Estradiol-17 $\beta$  in diesem Bereich des Hypothalamus die GnRH-Sekretion über die Beeinflussung der Neurotransmitter steuert.

Weiterhin zeigte sich, daß in dieser Phase durch Ausschüttung einer anderen LH-Isomform eine höhere Affinität am Rezeptor erreicht wird und damit eine erhöhte biologische Aktivität auftritt. Dies zeigte sich in Untersuchungen, in denen Unterschiede zwischen immunologischen und biologischen LH-Nachweisen auftraten (Marut et al. 1981, Alexander und Irvine 1982, Matteri et al. 1990, Pantke et al. 1991).

Auf zellulärer Ebene stimuliert Estradiol-17 $\beta$  die LH-Sekretion durch die Steigerung der cAMP-Synthese, ein Vorgang, der im Minutenzeitraum ablaufen kann (Kobayashi et al. 1978).

## **2.1.6.2. Progesteron**

### **2.1.6.2.1. Herkunft**

Präovulatorisch wird Progesteron vor allem von den Granulosazellen der Follikel gebildet (siehe Seite 15). Qualitativ ergeben sich jedoch deutliche tierartliche Unterschiede. Bei den Haussäugetieren ist praktisch nur beim Hund ein daraus resultierender Anstieg der Progesteronkonzentration im peripheren Plasma meßbar.

#### **2.1.6.2.2. Rezeptorbindung von Progesteron und Wirkung am Hypothalamus-Hypophysensystem**

Progesteron bindet an spezifische Progesteronrezeptoren, die im ZNS unter anderem im Hypophysenvorderlappen, im Hypothalamus und im cerebralen Cortex zu finden sind (Camacho-Arroyo et al. 1996, Goldsmith et al. 1997, Camacho-Arroyo et al. 1998). Progesteron wirkt vor allem hemmend auf die Ausschüttung von LH, bei der Ratte wurde aber auch eine positive Rückkopplung beschrieben. Zudem ist die Wirkung auf das Hypothalamus-Hypophysensystem stark vom Zyklusstand und der jeweiligen Konzentration von Estradiol-17 $\beta$  im Plasma abhängig.

Bei immaturren und matten Schafen hemmt Progesteron durch die Reduktion der GnRH-Freisetzung den durch Östrogene induzierten LH-Peak (Foster und Karsch 1975, Goodman und Karsch 1980, Karsch et al. 1987, Kasa-Vubu et al. 1992). Die durch Progesteron bedingte Hemmung der LH-Sekretion setzt allerdings eine vorherige Estradiol-17 $\beta$  Behandlung voraus (Girmus und Wise 1991). Dies begründet sich in der Estradiol-17 $\beta$  vermittelten Induktion der Expression der Progesteronrezeptor mRNA mit nachfolgender Steigerung der Progesteronrezeptorkonzentrationen in verschiedenen Regionen des Hypothalamus und des Hypophysenvorderlappens. Mit steigender Progesteronkonzentration werden wiederum die Estradiolrezeptoren im ventromedialen Nukleus des Hypothalamus und die Progesteronrezeptoren im Hypophysenvorderlappen herunter reguliert. Nachgewiesen wurde diese Induktion der Progesteronrezeptorsynthese mit nachfolgender „down-Regulation“ sowohl der Progesteron- als auch der Estradiolrezeptoren bei Affen und Kaninchen (Camacho-Arroyo 1994, Bethea et al. 1996, Camacho-Arroyo et al. 1996). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß die wechselseitigen Auswirkungen von Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron auf die jeweiligen Rezeptoren in den verschiedenen Bereichen des Hypothalamus-Hypophysensystems nicht einheitlich sondern sehr differenziert sind; danach spielt die jeweilige Lokalisation im ZNS ebenso eine Rolle wie die Isoform des Progesteronrezeptors (Camp und Barraclough 1985, Bethea et al. 1996, Bethea und Widmann 1998). Im Zusammenspiel mit Estradiol-17 $\beta$  reguliert Progesteron auf zellulärer Ebene auch die Expression der GnRH-mRNA, der  $\alpha$ -Untereinheit der Gonadotropine sowie der LH $\beta$ -Untereinheit. Aus diesem Zusammenhang läßt sich auch erklären, daß Progesterongaben bei ovariectomierten

Schafen mit durchtrennten Hypophysenstil (GnRH wird ersetzt) sowohl den negativen als auch den positiven Feedback von Estradiol-17 $\beta$  verstärken kann (Clarke und Cummins 1984).

Bei der Stute sinken während der Zuchtsaison unter Progesteroneinwirkung die LH-Konzentrationen im Plasma; in Kombination mit Estradiol-17 $\beta$  ist eine Verstärkung dieses Effektes festzustellen; im Anöstrus zeigt sich dieser Effekt nicht, so daß Garcia und Ginther (1978) daraus schlossen, daß ovarielle Steroide nicht an der Modulation der LH-Sekretion im Anöstrus beteiligt sind.

Bei Rind, Stute und Affe ist die negativ rückkoppelnde Wirkung von Progesteron nachweislich vom Zyklusstand abhängig. So ist es bei diesen Tierarten nicht möglich, während der Lutealphase bei erhöhten Progesteronkonzentrationen im Plasma mit exogenem Estradiol-17 $\beta$  einen LH-Peak auszulösen (Short et al. 1979, Lundblad et al. 1980). Unter der Voraussetzung, daß mit GnRH vorbehandelt wurde, steigert Progesteron bei der Stute im tiefen Anöstrus die basale FSH-Sekretion und stimuliert die Follikelentwicklung auch bei nicht mit GnRH behandelten Tieren; Evans und Irvine (1979) schlossen daraus, daß Progesteron eine Rolle in der Follikulogenese und dadurch indirekt bei der Ovulation zukommt.

Progesteron scheint im Rahmen des Steroidprimings einen direkten Einfluß auf das Hypothalamus-Hypophysensystem zu haben und bei einigen Tierarten eine entscheidende Rolle bei der Auslösung des präovulatorischen LH-Peaks zu spielen. So zeigt die ovariectomierte Hündin erst nach Vorbehandlung mit Progesteron eine durch Estradiol-17 $\beta$  ausgelöste, dem präovulatorischen LH-Peak ähnliche LH-Ausschüttung (Concannon 1979a).

Vor allem bei der Ratte wird eine direkte positive Feedback-Wirkung während des präovulatorischen LH-Peaks vermutet, da Estradiol-17 $\beta$  alleine die durch GnRH ausgelöste LH-Sekretion unterdrückt, wohingegen Progesteron in Abwesenheit von Estradiol direkt stimulierend auf die proöstrische Hypophyse wirkt (Turgeon und Waring 1981).

Progesteron hat beim Schaf, Meerschweinchen und der Ratte einen direkten Einfluß auf den Verhaltensöstrus; beim Schaf zeigen nur mit Progesteron vorbehandelte Tiere im Anöstrus nach GnRH-Gabe einen vollständigen Verhaltensöstrus mit nachfolgender normalen CL-Funktion; dabei ist die Ausprägung des präovulatorischen LH-Peaks un-

beeinflußt von der Vorbehandlung mit Progesteron (McLeod et al. 1982, Collado et al. 1985, Legan et al. 1985a, Delville und Blaustein 1991). Untersuchungen an der Ratte haben gezeigt, daß Progesteron die Adenylatcyklase aktiviert und die cAMP-Synthese in den Bereichen des ZNS stimuliert, die an der Ausprägung des Verhaltensöstrus beteiligt sind (Collado et al. 1985). Delville und Blaustein (1991) lokalisierten diesen Bereich beim Meerschweinchen im ventro-lateralen Hypothalamus.

Histologisch kann man feststellen, daß unter chronischer Behandlung mit Progesteron die sekretorische Aktivität der gonadotropen Zellen bei der Hündin abnimmt (Attia und Zayed 1979).

### **2.1.6.3. Inhibin**

Hauptquelle von Inhibin sind große antrale Follikel. Die Inhibinwerte im Plasma steigen in der Follikelphase mit dem Wachstum des dominanten Follikels an. Der Abfall von Inhibin nach dem präovulatorischen LH-Peak ist verantwortlich für einen zweiten Anstieg von FSH. Das umgekehrte Verhältnis von FSH und Inhibin steht im Einklang mit der Beobachtung, daß Inhibin in die Feedback-Regulation von FSH einbezogen ist (Findlay et al. 1990): Inhibin wirkt hemmend auf die FSH-Sekretion. Die Ausschaltung von Estradiol-17 $\beta$  hat keine direkte Auswirkung auf die FSH-Sekretion, verstärkt aber mittelbar die Wirkung von Inhibin.

Eine passive Immunisierung gegen Inhibin hat keine Auswirkung auf die positive Feedbackwirkung von Estradiol-17 $\beta$  (Kaneko et al. 1995).

### **2.1.7. Weitere Einflußfaktoren**

Die GnRH- und LH-Sekretion wird von einigen weiteren Faktoren beeinflusst. Beim Hund verhindert Arginin-Vasopressin die GnRH induzierte Freisetzung von LH durch direkten Angriff auf die vordere Hypophyse (Yamashita et al. 1979). Bei der Stute stimuliert eine Gabe von NMA (N-Methyl-DL-Aspartinsäure), einem Glutaminagonisten, die Freisetzung von LH und FSH (Fitzgerald 1996).

## **2.2. Effekte der Kastration**

Nach Ovariectomie stehen die einzelnen Gehirnregionen nicht mehr unter dem regulierenden Einfluß von Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron. Infolge dessen steigt die Expression der LH $\beta$ - sowie der LH $\alpha$ -mRNA in der Hypophyse an (Abbot et al. 1988, Mercer et al. 1988). Dies führt unter anderem bei der Hündin zu einem Anstieg der mittleren Konzentrationen von LH und FSH im Plasma (Olson et al. 1992). In Verbindung damit wurde auch ein Anstieg der Bindungsstellen für Naloxon im Hypothalamus beobachtet, wie aus Untersuchungen bei der Ratte hervorgeht (Weiland und Wise 1990).

Diese Veränderungen haben auch Auswirkungen auf das Feedbackverhalten von Estradiol: so ist das Ausmaß der GnRH-Antwort auf Estradiol-17 $\beta$  höher bei intakten als bei ovariectomierten Tieren (Xia et al. 1992).

Bei ovariectomierten Schafen führt Estradiol-17 $\beta$  zu einer typischen zweiphasigen Reaktion mit einer zunächst auftretenden negativen Feedbackphase, gefolgt von einer positiven Feedback-Phase. Während der negativen Feedbackphase sind sowohl die Frequenz als auch die Amplitude der GnRH-Pulse vermindert (Caraty et al. 1989).

## **2.3. Der Reproduktionszyklus der Hündin**

### **2.3.1. Einteilung der Zyklusphasen**

Der Zyklus der Hündin wird in Proöstrus, Östrus, Diöstrus und Anöstrus eingeteilt (Feldmann und Nelson 1987). Der Proöstrus beginnt mit dem Erscheinen von blutigem Ausfluß aus der Rima Vulvae. Der Östrus folgt mit Beginn der sexuellen Akzeptanz des Rüden. Die Dauer des Proöstrus wird mit 3 bis 16 Tagen angegeben. Der sich anschließende Östrus dauert 4 bis 12 Tage. Mit dem Abbeißen des Rüden durch die Hündin und dem Erscheinen neutrophiler Granulozyten im Abstrichbild endet der Östrus. Der Diöstrus dauert bei der trächtigen Hündin 59 bis 65 Tage und wird durch die Geburt terminiert, bei der nichtträchtigen Hündin dauert er bis zu 90 Tage und endet, definitionsgemäß, wenn die Progesteronkonzentration im peripheren Plasma unter 1 ng/ml abgesunken ist. Bei der Hündin schließt sich nach dem Diöstrus eine Phase individuell unterschiedlicher Länge an (15-265 Tage), in der eine weitgehende „Ovarruhe“ zu beobachten ist, der Anöstrus (Übersicht siehe Höveler 1991).

### **2.3.2. Morphologische und hormonelle Veränderungen während der Zyklusphasen**

#### **2.3.2.1. Proöstrus**

Zu Beginn des Proöstrus sind die Labien der Vulva geringgradig ödematisiert und blutiger Ausfluß ist sichtbar. Im vaginalzytologischen Abstrich steigt mit fortschreitendem Proöstrus die Anzahl der Intermediär- und Superfizialzellen, wogegen die Anzahl der Basal- und Parabasalzellen abnimmt. Zum Ende des Proöstrus sind keine Basal- und Parabasalzellen im Abstrich zu finden und die Vulva ist stark ödematisiert. Während der gesamten Zeit des Proöstrus sind Erythrozyten im Abstrich zu finden, die gegen Ende des Proöstrus allerdings deutlich weniger werden. Vaginoskopisch sieht die Vaginalschleimhaut feucht und längsgefaltet aus. Im Ovar bilden sich bis zum Ende des Proöstrus Grafsche Follikel mit einem Durchmesser von  $6,9 \pm 0,7$  mm an (Hayer et al. 1993, Monniaux et al. 1997).

Hormonell ist der Proöstrus durch einen Anstieg der Estradiol-17 $\beta$  Konzentrationen auf Werte bis zu ca. 90 pg/ml Plasma gekennzeichnet; danach ist gegen Ende des Proöstrus ein rascher Abfall auf Basalwerte um 10 – 20 pg/ml festzustellen (Jones 1973; Hoff-

mann et al. 1992). Progesteron bleibt bis kurz vor Ende des Proöstrus auf Werten unter 1 ng/ml Plasma und steigt im Übergang zum Östrus auf Werte über 1 ng/ml Plasma an. Die basale Ausschüttung des Luteinisierenden Hormons ist, bedingt durch die Hemmung der erhöhten Estradiolkonzentrationen, während des Proöstrus gering, die Sekretion ist aber auch im Proöstrus pulsatil (Concannon 1993, Hoffmann et al. 1996, Riesenbeck 1997). Die FSH-Sekretion ist im Proöstrus am niedrigsten (Olson et al. 1982b, Concannon 1993), eventuell bedingt durch die negative rückkoppelnde Wirkung von im Proöstrus vermehrt ausgeschüttetem Inhibin (gebildet in den Granulosazellen der Follikel) und Estradiol-17 $\beta$ .

Im Proöstrus steigt die Anzahl prolaktinproduzierender Zellen in der Hypophyse, aber ohne parallele Steigerung der sekretorischen Aktivität. Gleichzeitig sind die LH und FSH produzierenden Zellen hypertrophiert, sie zeigen als Zeichen erhöhter sekretorischer Aktivität große vesikuläre Nuclei und ein vermehrtes Auftreten von Golgiapparaten (Attia 1989).

#### **2.3.2.2. Östrus**

Die Labien der Vulva sind stark ödematisiert und von teigiger Konsistenz, blutiger Ausfluß ist meist nicht mehr sichtbar. Im Abstrich finden sich vor allem kernlose verhornte Superfizialzellen, die sich unter Progesteroneinfluß zu Nestern zusammenlagern (Zusammenfassung in Gerres 1991), Erythrozyten verschwinden aus dem Abstrichbild. Die Ovulation findet  $6,9 \pm 1,6$  Tage nachdem 80% der Vaginalzellen Superfizialzellen sind bzw.  $2,1 \pm 3,9$  Tage nach dem ersten Tag der Standhitze statt (Bouchard et al. 1991). Die maximale Anzahl anukleärer Zellen im Vaginalabstrich wird zwischen 1,9 oder 4,4 Tagen nach dem präovulatorischen LH-Peak erreicht, der am Übergang von Proöstrus zum Östrus auftritt (England 1992). Vaginoskopisch wirkt die Schleimhaut trocken und es finden sich Längs- und Querfaltungen.

Bis zur Ovulation, d.h. 48 bis 62 Stunden nach dem LH-Peak, reifen die Grafschen Follikel zu sprungreifen Follikeln heran.

Der zu Beginn des Östrus auftretende und zur Ovulation führende präovulatorische LH-Peak hält bis zu 86 Stunden an, wobei Maximalwerte ein oder zwei Tage nach Beginn des Östrus erreicht werden (Jones et al. 1973). Diesem Peak voran geht eine Luteinisierung der Tertiärfollikel mit langsam steigenden Progesteronwerten im peripheren

Plasma bis auf  $4,9 \pm 1,0$  ng/ml zum Zeitpunkt der Ovulation (Bouchard et al. 1991, Concannon 1993), um dann innerhalb von 2 Tagen, auf Werte von über 20 ng/ml Plasma zu steigen. Estradiol-17 $\beta$  ist am Ende des Proöstrus, d.h. 24 bis 48 Stunden vor dem LH-Peak, auf Basalwerte gesunken. Der Abfall der Estradiol-17 $\beta$  Konzentrationen im späten Proöstrus bei gleichzeitig langsam ansteigenden Progesteronwerten ist, wie an ovariectomierten Hündinnen gezeigt wurde, essentiell für die Auslösung des LH-Peaks (Concannon et al. 1979a; Concannon 1993) und für das vollständige Östrusverhalten (Concannon et al. 1979b). Die LH-Konzentration in der Hypophyse fällt stark vom Ende des Proöstrus bis zum zweiten Tag des Diöstrus (Fernandes 1987). In enger Korrelation mit dem LH-Peak ist ein 4 - 5 tägiger FSH-Peak zu beobachten. Die im Vergleich zum LH-Peak deutlich längere Zeitdauer des FSH-Peaks wird mit einer längeren Halbwertszeit von FSH begründet (Olson et al. 1982a, Concannon 1993).

#### **2.3.2.3. Diöstrus**

Der Diöstrus, auch als Metöstrus bezeichnet, beginnt  $6,8 \pm 1,6$  Tage nach der Ovulation (Bouchard et al. 1991). Im Abstrichbild zeigen sich mit Beginn des Diöstrus neutrophile Granulozyten, die Ödematisierung nimmt ab und die sexuelle Akzeptanz ist nicht mehr vorhanden.

Progesteron steigt auf Konzentrationen von über 20 ng/ml Plasma an, um nach 20 Tagen allmählich abzufallen. Der Konzentrationsverlauf der Hormone Estradiol-17 $\beta$ , LH und Progesteron ist bei graviden und ingraviden Hündinnen bis kurz vor dem Geburtszeitpunkt nahezu identisch.

In den ersten 20 Tagen des Diöstrus scheint die Funktion der Corpora lutea weitgehend gonadotropinunabhängig zu verlaufen, da weder nach Hypophysektomie (Concannon 1980; Okkens et al. 1986), noch nach Ausschaltung von LH und Prolaktin (Concannon et al. 1987), in diesem Zeitraum nachhaltige Funktionsänderungen beobachtet werden konnten. Für den weiteren Erhalt der lutealen Funktion ist jedoch eine hypophysäre Unterstützung notwendig, da bei Entfernung der Hypophyse nach dem 20. Tag des Diöstrus die Progesteronkonzentration - als Indikator für die luteale Integrität - im Plasma stark absinkt und erst nach Gabe von LH wieder ansteigt. Als luteotrope Faktoren wurden beim Hund LH (Concannon 1980) und insbesondere Prolaktin identifiziert (Okkens und Bevers 1990, Onclin et al. 1993, Onclin und Verstegen 1997a).



Die sekretorische Aktivität der Prolaktin produzierenden Zellen steigt während des Diöstrus des Hundes an. Dabei wurde postuliert, daß dies ein Progesteron vermitteltes Phänomen ist (Attia 1989). Obwohl tragende und nicht tragende Hündinnen über ca. 60 Tage im Diöstrus einen ähnlichen Verlauf der Progesteronkurve aufweisen, werden bei graviden Tieren ab dem 35 Tag signifikant höhere Prolaktinwerte im Plasma gemessen als bei ingraviden (Onclin und Verstegen 1997b). Jedoch ändert sich die Rezeptorzahl im Corpus Luteum für LH und Prolaktin nicht wesentlich im Verlauf der Lutealphase (Fernandes et al. 1987).

Der Diöstrus ist bei der graviden Hündin durch die Geburt nach durchschnittlich 63 Tagen terminiert und der die Geburt auslösende Abfall der Progesteronkonzentration im Plasma 24 Stunden zuvor ist wahrscheinlich Prostaglandin - vermittelt (Hoffmann et al. 1996; Riesenbeck 1997). Die luteolytischen Mechanismen bei der ingraviden Hündin sind noch weitgehend unbekannt. So konnte ein Luteolysin uterinen Ursprungs ausgeschlossen werden (Olson et al. 1984, Hoffmann et al. 1992) ebenso wie ein Mangel an hypophysär verfügbarem LH (Hoffmann und Schneider 1993) oder ein Mangel an Prolaktin (Onclin und Verstegen 1997b). Aus diesem Grund werden auto- und parakrine Regulationsmechanismen für die luteale Regression verantwortlich gemacht (Hoffmann et al. 1996).

#### **2.3.2.4. Anöstrus**

Der Anöstrus ist definiert als der Zustand (Anöstrus) oder Zeitraum (Phase) der Brunstlosigkeit.

Im allgemeinen kann man zwei Arten des Anöstrus unterscheiden:

1. den saisonalen vor allem durch exogene Faktoren wie Tageslichtlänge, aber auch Futter und Wasserangebot beeinflussen Anöstrus, der vor allem bei Wildtieren ausgeprägt ist, aber unbeschadet der Domestikation auch noch bei den Haustieren Pferd, Katze, Ziege und Schaf beobachtet werden kann,
2. den Laktationsanöstrus, der u.a. beim Schwein, beim Rind und beim Menschen zu beobachten ist und durch Vorgänge, die durch den Saugreiz ausgelöst werden, reguliert wird.

Im folgenden Kapitel wird, entsprechend dem derzeitigen Kenntnisstand, zunächst

auf grundlegende Aspekte der neuro-endokrinen Kontrolle eingegangen, ehe in den dann folgenden Kapiteln die spezielle Situation des saisonalen Anöstrus und des Laktationsanöstrus angesprochen wird.

#### **2.3.2.4.1. Grundlegende Aspekte der neuro-endokrinen Regulation des Anöstrus**

Catecholamine aus dem ZNS, speziell Dopamin, scheinen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Anöstrus zu spielen, ohne dabei direkt in den positiven Feedback Mechanismus der Östrogene einzugreifen.

Zentral am Hypophysenvorderlappen wirkendes Dopamin wird in den Neuronen des tuberoinfundibulären dopaminergen Systems (TIDA) gebildet, welches am Hypophysenstiel liegt. Dopamin kommt vor allem eine Bedeutung in der Regulation der Prolaktinsekretion aus der Hypophyse zu. Es ist der wichtigste hemmende Faktor der Prolaktinsekretion und –synthese. Die sich hieraus ergebenden Effekte auf die Regulation der Ovaraktivität sind jedoch tierartlich unterschiedlich. Die Wirkung von Dopamin wird über D2-Rezeptoren vermittelt und führt zur Verminderung der cAMP-Bildung (Döcke 1994a). Neben Dopamin hemmt auch das Catecholamin Noradrenalin die Prolaktinsekretion, wie Untersuchungen beim Schaf gezeigt haben (Thomas et al. 1989). Beim Schaf wurde auch gezeigt (Lehman 1996), daß die dopaminergen Neurone A14/A15, die nur während des Anöstrus durch Östrogene aktiviert werden, wahrscheinlich für die Übermittlung der hemmenden Wirkung der Östrogene auf die LH-Sekretion verantwortlich sind. Im Anöstrus verhindert Estradiol-17 $\beta$  durch Unterdrückung des hypothalamischen Pulsgenerators die Wiederaufnahme eines Zyklus (Legan et al. 1985b). Dies geschieht über die Einwirkung auf den retrochiasmatischen Bereich über den dopaminergen A15 Nucleus (Gallegos-Sánchez et al. 1997). Die Dopaminsekretion unterliegt verschiedenen regulierenden Faktoren, zu denen unter anderem auch endogene Opioide (hemmend) und Östrogen (stimulierend) gehören (Döcke 1994a).

Durch Manipulation des dopaminergen Systems kann der Anöstrus beeinflusst werden. Untersuchungen dazu liegen insbesondere für den Hund vor, worauf in Kap 2.3.2.4.4 eingegangen wird. Allerdings konnte auch bei der Stute gezeigt werden, daß durch die Verabreichung des Dopamin D2 Antagonisten Sulpiride die erste Ovulation bei saisonal anöstrischen Stuten signifikant vorverlegt werden kann. Die Be-

handlung mit D2-Antagonisten führte zu einer erhöhten mittleren FSH-Pulsfrequenz am ersten Tag der Behandlung und später zu einer Erhöhung der mittleren FSH-Konzentration im Plasma. Wirkungen auf das Muster der LH-Sekretion zeigten sich nicht, so daß postuliert wurde, daß Dopamin die pulsatile FSH-Sekretion bei saisonal anöstrischen Stuten hemmt (Besognet et al. 1996).

Zahlreiche Untersuchungen bei unterschiedlichen Spezies beschäftigten sich mit weiteren Faktoren, die das Auftreten des ersten Östrus nach der Anöstrusperiode beeinflussen. Ein wichtiger Faktor scheint dabei auch die Energiezufuhr zu sein. So stellte Karlberg (1980) fest, daß bei Sauen mit einem verminderten Futterangebot das Zeitintervall bis zum Auftreten des ersten Östrus signifikant länger war als bei Tieren, die ausreichend ernährt wurden. Wie bei weiblichen Ratten festgestellt wurde, führt Unterernährung aufgrund von FSH-Mangel zur Abnahme der Follikelentwicklung und dadurch zur Anöstrie (McShane und Keisler 1991, Sprangers und Piacsek 1997).

#### **2.3.2.4.2. Saisonaler Anöstrus**

Beim saisonalen Anöstrus unterscheidet man sogenannte „long-day“ und „short-day“ Breeder, bei denen der Übergang in die Zuchtsaison mit der Verlängerung beziehungsweise Verkürzung der Tageslichtlänge einhergeht.

Interner Zeitgeber für die sich ändernde Tageslichtlänge ist das von der Epiphyse sezernierte Melatonin. Dabei gilt, daß unabhängig von der Tierart die Melatoninwerte mit Beginn der Dunkelphase rasch ansteigen und mit deren Beendigung rasch wieder abfallen. Im Hinblick auf die unterschiedliche Reaktion (long-day vs. short-day Breeder) der einzelnen Tierarten auf ein gleiches endogenes Signal ist zu unterstellen, daß die Signalumsetzung speziesspezifisch erfolgt (Kennaway und Rowe 1995, Kumar 1997, siehe Zusammenfassungen von Wehr 1997).

Unabhängig von den unterschiedlichen Mechanismen der Signalumsetzung ist, wie von Karsch et al. (1993) beim Schaf gezeigt werden konnte, der Beginn des Anöstrus auf eine Erhöhung der negativ rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  zurückzuführen. Umgekehrt ist das Ende des Anöstrus durch eine Desensibilisierung des Hypothalamus-Hypophysensystems auf die negative Rückkopplung und die erneut auftretende positive Rückkopplung von Estradiol-17 $\beta$  gekennzeichnet. Diese Feststellung

wird durch Untersuchungen an ovariectomierten Schafen bestätigt, bei denen dosisabhängig durch Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  die erhöhte LH-Sekretion gehemmt werden konnte (Goodman und Knobil 1981); kleine Dosen wiesen außerhalb der Zuchtsaison eine deutlich stärkere Hemmwirkung auf, als innerhalb der Zuchtsaison. Unabhängig von der Qualität der saisonabhängigen negativ rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  wurde beim Schaf beobachtet, daß es mit Verkürzung der Tageslichtlänge zu einer Erhöhung der LH-Pulsfrequenz kam. Robinson et al. (1985) schlossen daraus, daß unterschiedliche neuroendokrine Mechanismen die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  und die Pulsatilität von LH steuern.

Auch während der Periode des Anöstrus erfolgt beim Schaf eine Follikelentwicklung und Steroidsekretion. Dies geschieht in Wellen, wobei der ansteigende und statische Teil synchron verlaufen, Ovulationen treten jedoch nicht auf (Souza 1996).

Während Prolaktin beim Schaf beim Übergang in die Zuchtsaison (Land 1980, Worthy et al. 1985) und von der Zuchtsaison in den Anöstrus keine Bedeutung zuzukommen scheint (Worthy und Haresign 1983), konnte die Schilddrüse als ein für die Regulation des Anöstrus wichtiges Organ erkannt werden.

Die Thyroxin (T<sub>4</sub>) Sekretion zeigt einen jahreszeitlichen Rhythmus mit Maximalwerten in der späten Zuchtsaison (Winter) und niedrigen Konzentrationen im späten Anöstrus (Sommer). Thyroxin ist nach Beginn der Zuchtsaison für den endogen bedingten Wechsel in der neuroendokrinen Achse mitverantwortlich, indem es zu einer Intensivierung der negativ rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  am Ende der Zuchtsaison führt (Webster et al. 1991b). Nach Thyreoektomie am Ende der Zuchtsaison wurde kein Übergang in den Anöstrus zu beobachten, die Sekretionsmuster von GnRH und LH zeigten nicht die bei intakten Tieren zu beobachtenden Veränderungen (Webster et al. 1991a).

Für den Anöstrus der Stute sind niedrige Progesteron und Estradiolwerte im Plasma charakteristisch, ein Hinweis auf einen Zustand ovarieller Ruhe (Oxender et al. 1977). Unbeeinflusst von ovariellen Steroiden folgt die Sekretion von LH bei der ovariectomierten Stute einem saisonalen Muster, das durch niedrige Basalkonzentrationen während des saisonalen Anöstrus und hohen Basalkonzentrationen während der Zuchtsaison gekennzeichnet ist (Garcia und Ginther 1978).

Eine direkte Beeinflussung der LH-Pulsfrequenz durch Veränderung der Tageslichtlänge ist sowohl beim Schaf als auch bei der Stute zu beobachten (Nequin et al. 1990). Der Übergang vom Anöstrus in die Zuchtsaison im Frühjahr geht bei der Stute mit einer Steigerung der LH-Pulsfrequenz, die durch eine Erhöhung der pulsatilen GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus verursacht wird, einher (Safir et al. 1987). Im Gegensatz dazu sinkt die FSH-Pulsamplitude bei der Stute während des Übergangs in die Zuchtsaison, und der Abfall der Amplitude ist verbunden mit einem Abfall der mittleren FSH-Konzentrationen im Serum (Hines et al. 1991). Der Gehalt hypophysären LH's steigt fortschreitend vom Anöstrus zur Zuchtsaison an. Keine Veränderungen sind dabei im GnRH-Gehalt des Hypothalamus, dem GnRH-Rezeptorgehalt und dem FSH-Gehalt der Hypophyse festzustellen (Silvia et al. 1986, Silvia et al. 1987).

Durch Manipulation einzelner Faktoren, die an der Beendigung des Anöstrus beteiligt sind, ist es möglich, auch in der eigentlichen jahreszeitlichen Anöstrusphase einen fertilen Östrus auszulösen.

So kann durch eine pulsatile GnRH Gabe bei der Stute (Johnson 1986, Hyland et al. 1987, Johnson 1987, McCue et al. 1991) oder LH Behandlung beim Schaf (McNatty 1984) saisonunabhängig ein fertiler Östrus ausgelöst werden.

Durch Verlängerung der Tageslichtphase bei der Stute (Sharp et al. 1975, Oxender et al. 1977) bzw. Verkürzung beim Schaf (Jansen und Jackson 1993) kann im Anöstrus ein fertiler Östrus ausgelöst oder der Beginn der Zuchtsaison vorverlegt werden (Kooistra und Ginther 1975, Fitzgerald et al. 1987), ebenso wie es durch Verkürzung der Lichteinwirkung möglich ist, den Beginn der Zuchtsaison bei der Stute zu verzögern. Die Zuchtsaison der Stute hat keine feste Zeitspanne, so daß ein Vorverlegen der Zuchtsaison nicht gleichzeitig einen früheren Übergang in den Anöstrus bedeutet. Auch kann der Beginn des Anöstrus durch Verlängerung der Lichtdauer hinausgezögert werden (Kooistra und Ginther 1975). Sowohl beim ersten Östrus, der durch Änderung des Lichtregimes auftritt, als auch beim Übergang in die Zuchtsaison, ist der periovulatorische LH-Peak niedriger als bei den folgenden Zyklen (Silvia et al. 1986, Fitzgerald et al. 1987).

Die Beendigung des Anöstrus beschleunigende Faktoren sind beim Schwein auch Reize, die z. B. von östrischen Sauen ausgehen, oder die Anwesenheit eines Ebers

(Pearce und Pearce 1992).

Auch bei scheinbar asaisonalen Tieren kann noch ein saisonaler Einfluß erkannt werden: so haben Kühe, die im Frühjahr kalben, einen längeren postpartalen Anöstrus (Lamming et al. 1981). Vor allem bei primiparen Sauen sind saisonale Unterschiede am GnRH-Gehalt des Hypothalamus und dem LH-Gehalt in der Hypophyse zu erkennen, ebenso wie am Anöstrusintervall vom Absetzen der Ferkel bis zum ersten Östrus (Karlberg 1980, Claus et al. 1985, Armstrong et al. 1986, Xue 1994, Peltoniemi et al. 1999).

#### **2.3.2.4.3. Laktationsanöstrus**

Der bei Schwein, Rind und Mensch beschriebene Laktationsanöstrus ist gekennzeichnet durch erhöhte Prolaktinkonzentrationen im Plasma bei gleichzeitig herabgesetzter LH-Ausschüttung mit erniedrigter Basalkonzentration, Pulsfrequenz und Pulsamplitude (Gordon et al. 1987).

Wichtige Faktoren für die Entstehung des Laktationsanöstrus sind endogene Opiode, u.a.  $\beta$ -Endorphin, die über  $\mu$  - Rezeptoren (s. Kap. 2.1.3) die GnRH-Pulsatilität hemmen und darüber hinaus in höheren Dosen die Prolaktinsekretion fördern. Dabei gilt, daß hypothalamisches  $\beta$ -Endorphin über den Säugereiz ausgeschüttet wird (Gordon et al. 1987), wobei eine direkte Beziehung zur Säugefrequenz besteht (Stewart 1988, Gordon und Siegmann 1991). Weiter kann unterstellt werden, daß die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  auf die LH und FSH Ausschüttung während der Laktation erhöht ist (Baird et al. 1979, Vemer und Rolland 1982).

Speziell beim Schwein konnte gezeigt werden, daß sich die Empfindlichkeit des Hypothalamus-Hypophysensystems auf Estradiol-17 $\beta$  im Verlauf des Laktationsanöstrus verändert. Zu Beginn ist durch Estradiol-17 $\beta$  keine positiv rückkoppelnde Wirkung auf die LH-Ausschüttung meßbar, erst ab dem 2. Drittel der Säugeperiode ist dies möglich (Elsaesser und Parvizi 1980, Cox et al. 1988), was möglicherweise mit der abnehmenden Säugefrequenz zusammenhängt. Rassebedingte Unterschiede sind während des Laktationsanöstrus beim Schwein von untergeordneter Bedeutung (Elsaesser et al. 1992).

Neben der Hemmung der GnRH-Freisetzung durch endogene Opiode und die verstärkt negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  wurde auch berichtet, daß die während der Laktation deutlich erhöhten Prolaktinwerte direkt die Wirkung von LH am Ovar hemmen, wie Untersuchungen bei der Frau gezeigt haben (Glasier et al. 1984).

#### **2.3.2.4.4. Der Anöstrus des Hundes**

Beim Haushund, der als asaisonal monöstrisches Tier einzustufen ist, kann der Anöstrus nicht eindeutig den oben beschriebenen Typen zugeordnet werden. Auch beim Hund kann während der Laktation eine durch Opioide vermittelte Herabsetzung der LH-Sekretion durch Naloxon aufgehoben werden (Concannon und Temple 1988), aber die Hündin kehrt nach dem Absetzen der Welpen nicht ins zyklische Geschehen zurück, wie dies z.B. bei Schweinen für über 70% der pluriparen Tiere innerhalb von 7 Tagen der Fall ist (Karlberg 1980). Zudem tritt dieser Anöstrus auch bei nicht laktierenden Tieren auf.

Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, daß beim Haushund nur im geringen Maße exogene Faktoren für Eintreten und Beendigung des Anöstrus verantwortlich sind, so daß es sich um ein wahrscheinlich bevorzugt endogen kontrolliertes Geschehen handelt. Die hormonelle Situation bei der Hündin beim Übergang vom Diöstrus in den Anöstrus ist dadurch gekennzeichnet, daß bei auf unterem diöstrischem Niveau verlaufenden Estradiol-17 $\beta$  Konzentrationen die bis zum Ende des Diöstrus angestiegene Verfügbarkeit von LH plötzlich nicht mehr gegeben ist (Hoffmann et al. 1996, Riesenbeck 1997). Da Progesteron in dieser Phase auf <1ng/ml Plasma abgefallen ist, kann nicht mehr von einer negativ rückkoppelnden Wirkung von Progesteron ausgegangen werden. Ob dieser Vorgang mit einer erhöhten Sensibilisierung des Hypothalamus-Hypophysensystems auf die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  zusammenhängt, wurde bisher nicht untersucht. Auch inwieweit den in dieser Phase erhöhten Prolaktinkonzentrationen eine Rolle zukommt, bedarf weiterer Untersuchungen. So ist die durchschnittliche Prolaktinausschüttung während des Übergangs vom Diöstrus zum Anöstrus und während des frühen Anöstrus erhöht gegenüber dem des späten Anöstrus (Jeffcoate 1993).

Sicher ist jedoch, daß beim Hund Faktoren, die die Prolaktinsekretion regulieren, eine Rolle spielen. Ein Dopaminagonist kann den Anöstrus beenden und normale, fertile Zyklen auslösen (Haaften van 1989, Verstegen et al. 1993, Onclin et al. 1995, Jeukenne. 1997). Allerdings spielt der Zeitpunkt der Behandlung eine Rolle, da die Ansprechbarkeit auf den Dopaminagonisten mit dem Fortschreiten des Anöstrus zunimmt. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, daß Dopamin in Dosierungen, welche die Prolaktinsekretion reduzieren, die LH-Sekretion kurzfristig erhöhen können. Nachdem die FSH-

Sekretion unverändert bleibt schlossen daraus Onclin et al. (1995), daß andere Veränderungen als nur die Reduzierung von Prolaktin und die Erhöhung von LH für die follikuläre Antwort des Hundes auf die Behandlung mit Dopaminagonisten verantwortlich sein müssen. Des weiteren zeigte sich, daß die alleinige Unterdrückung der Prolaktinwerte nicht einen vorzeitigen Östrus auslösen kann. Die Auslösung des Östrus wird in erster Linie durch Dopaminagonisten vermittelt; andere dopaminerge Wirkungen können für die follikulären Antworten verantwortlich sein, die zur Ovulation führen.

Da bei der Hündin unter physiologischen Bedingungen keine offensichtlichen Veränderungen der Prolaktinwerte während des späten Anöstrus und dem Übergang in den Proöstrus beobachtet wurden, könnte die den Östrus auslösende Rolle der absinkenden Prolaktinkonzentrationen in Frage gestellt werden (Okkens et al. 1997).

Jeffcoate (1993) stellte fest, daß sich die LH-Sekretion als Antwort auf die Gabe von GnRH im Laufe des Anöstrus nicht ändert. Van Haaften (1994) hingegen berichtet, daß die Empfindlichkeit der Hypophyse auf GnRH im frühen Anöstrus geringer ist als im späten, wobei eine starke Dosisabhängigkeit zu finden war. Die Ovarien reagieren auf die LH-Sekretion, gemessen an der Estradiol-17 $\beta$  Ausschüttung, entsprechend. GnRH-Gaben führen bei anöstrischen Hündinnen zu einem raschen Estradiol-17 $\beta$  Anstieg im Serum, ohne die Progesteronsekretion zu beeinflussen, wogegen FSH-Gaben zu steigenden Estradiol-17 $\beta$ - und Progesterongehalten im Serum führen (Vanderlip et al. 1987). Auch beim Hund ist es möglich, mit pulsatilen GnRH-Gaben (Cain et al. 1988, Concannon et al. 1997) oder LH-Administration (England und Allen 1991, Verstegen et al. 1997) einen fertilen Östrus im Zeitraum des Anöstrus auszulösen, obwohl sich die durch hCG oder PMSG (pregnant mare serum Gonadotropin) induzierten Östrusperioden von spontanen Zyklen durch den signifikant späteren Zeitpunkt der Kornifikation des Vaginalepithels, die generell höheren Konzentration von Östrogenen im Plasma und niedrigeren Progesteronkonzentrationen unterscheiden (England und Allen 1991). Die physiologische Sekretion von LH scheint während des späten Anöstrus zu steigen, sie ist auch während des Anöstrus pulsatil (Olson et al. 1982a, Jeffcoate 1993, Hoffmann et al. 1996).

Beim Hund konnte im peripheren Blut während des frühen und mittleren Anöstrus Estradiol-17 $\beta$  nicht oder nur in Spuren nachgewiesen werden. Erst einen Monat vor Beginn des Proöstrus ist ein Anstieg festzustellen, der - abgesehen von einem Einbruch vor



den ersten Anzeichen des Proöstrus - bis vor den präovulatorischen LH-Peak anhält (Olson et al. 1982a, Jeffcoate 1993, Hoffmann et al. 1996). Gleichzeitig steigt im Verlauf des Anöstrus die Expression der mRNA des Östrogenrezeptors im mediobasalen Hypothalamus, um danach wieder abzusinken. Diese Expression ist im Anöstrus und Proöstrus positiv korreliert mit den LH-Plasmakonzentrationen. Tani et al. (1997) schlossen daraus, daß die Expression der mRNA des Östrogenrezeptors im Hypothalamus im Verlauf des Anöstrus steigt und wahrscheinlich von Estradiol hochreguliert wird.

Die Progesteronkonzentrationen im Ovargewebe bleiben über den Beginn des Anöstrus auf erhöhten Werten und erreichen erst um den 150 Tag Basalniveau. Die Rolle von noch residualem Progesteron in den Ovarien der anöstrischen Hündin ist unklar (Versteegen et al. 1996).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Vorversuche zur Festlegung des Behandlungsschemas mit Estradiol-17 $\beta$**

Ziel der Vorversuche war es, durch Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  eine Verlaufskurve im peripheren Plasma zu induzieren, die zumindest annähernd der Freisetzung von Estradiol-17 $\beta$  im Proöstrus entspricht.

##### **3.1.1. Tiermaterial**

Verwendet wurden drei Hunde in Privatbesitz verschiedener Rassen sowie vier institutseigene Beaglehündinnen. Es handelte sich dabei um folgende Tiere:

- Sophie: Eine siebeneinhalb Jahre alte Deutsche Schäferhund-Mischlings-Hündin, die im Alter von einem Jahr kastriert worden war,
- Boogi: eine siebenjährige Soft Coated Wheaton Terrier Mischlings Hündin, deren Kastrationszeitpunkt nicht bekannt war,
- Nadie: eine einjährige Coton de Tuléar Hündin, die sich zu Versuchsbeginn am Ende des Diöstrus befand,
- Asta: eine zweijährige Beaglehündin im Anöstrus,
- Sally: eine zweijährige Beaglehündin, bei der der Versuch am Tag 48 post ovulationem begann,
- Pebbels: eine einjährige Beaglehündin, bei der zu Versuchsbeginn die Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma seit einer Woche kleiner 10 ng/ml lagen,
- Jeanie: eine einjährige Beaglehündin, bei der die Progesteronkonzentration im peripheren Plasma bei Versuchsbeginn seit einer Woche unter 1 ng/ml lag.

##### **3.1.2. Durchführung der Vorversuche**

Vorversuch a)

Zu einer ersten Orientierung wurden 4 Hündinnen (Sophie, Boogi, Nadie und Asta) am Tag Null um 8<sup>00</sup> Uhr unmittelbar nach der ersten Blutentnahme mit einer Injektion von

4 µg Estradiol-17β/kg KGW behandelt (Estradiol-17β lag in der Konzentration von 40µg/ml Olivenöl vor). Die weiteren Blutentnahmen erfolgten um 10<sup>00</sup>, 12<sup>00</sup>, 14<sup>00</sup>, 18<sup>00</sup>, 24<sup>00</sup> und danach alle acht Stunden, bis zu erwarten war, daß die Ausgangswerte wieder erreicht waren.

#### Vorversuch b)

Da das in Vorversuch a) gemessene Estradiol-17β-Profil nicht dem proöstrischen Estradiol-17β-Profil entsprach (zu kurze Bioverfügbarkeit bei zu hohen Spitzenwerten, siehe Abb. 5 Seite 64), wurde ein weiterer Versuch an zwei Beaglehündinnen unter Verwendung des Handelspräparates Menformon K<sup>®</sup> (40 µg Estradiolbenzoat/ml  $\hat{=}$  28,9 µg Estradiol-17β/ml) durchgeführt.

Aufbauend auf den Erfahrungen von Hoffmann und Gerres (1988) wurde folgendes Behandlungsschema gewählt:

Tag 0: 2,5 µg Estradiolbenzoat/kg KGW um 8<sup>00</sup>  
Tag 1: 5,0 µg Estradiolbenzoat/kg KGW um 8<sup>00</sup>  
Tag 2: 5,0 µg Estradiolbenzoat/kg KGW um 8<sup>00</sup>

Jeder Behandlung ging eine Blutentnahme voraus, die übrigen Entnahmen wurden wie folgt durchgeführt: beginnend um 8<sup>00</sup> des ersten Tages in 6 stündigen Intervallen bis zum folgenden Tag um 8<sup>00</sup>; ab diesem Zeitpunkt in 8 stündigen Intervallen bis zum Ablauf von insgesamt 168 Stunden.

### 3.2. Hauptversuche

#### 3.2.1. Tiermaterial

Zur Verfügung standen fünf Hündinnen der Rasse Beagle.

Die dreijährige Hündin Sally, die am 23.6.1993 geworfen hatte, wurde nach der folgenden Läufigkeit am 21.3.1994 in den Versuch aufgenommen. Die vier ca. 1 Jahr alten Hündinnen Billi, Pebbels, Lena und Jeani wurden nach den ersten Läufigkeiten am 6.4.1994; 8.4.1994 ; 6.4.1994 bzw. am 11.3.1994 in den Versuch aufgenommen. Die Haltung erfolgte in Gruppen in Zwingern mit Betonboden und Sägespäneinstreu. Die Fütterung erfolgte mit einem Gemisch aus kommerziellem Trocken- und Dosenfutter. Die Zyklusphasen (Anöstrus, Proöstrus, Östrus und Diöstrus) wurden visuell durch Be-

obachtung der Labien und des Sekretes im Bereich der Rima Vulvae und mittels Messung von Progesteron im Blutplasma bestimmt.

### **3.2.2. Durchführung der Untersuchungen zur LH-Freisetzung**

Ziel der Versuche war es zu überprüfen, inwieweit durch die Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  in der Mitte des Diöstrus und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Anöstrus ein positiv-rückkoppelnder Effekt auf die LH-Freisetzung induziert werden kann. Dazu war es notwendig, parallel zum Beginn der Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  Blutproben zur Bestimmung von LH über einen definierten Zeitraum zu gewinnen. Dieser wurde in Anlehnung an die Gegebenheiten im Proöstrus und Östrus (Dauer der Estradiol-17 $\beta$  Freisetzung 3-9 Tage; Dauer der nachfolgenden LH-Freisetzung 1-3 Tage) auf 7 Tage festgelegt und als Versuchsphase bzw. Kontrollphase (siehe Kap. 3.2.2.2) bezeichnet.

Zur Abdeckung der Periode des Anöstrus wurden Versuchs- bzw. Kontrollphasen in 5-wöchigen Abständen eingeplant. Dabei wurde unterstellt, daß durch die gewählten Abstände keine direkten Wirkungen der vorausgehenden Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  mehr gegeben waren. Der Versuchsplan sah weiter vor, nach einer ersten Läufigkeit mit den Versuchsphasen A (Anöstrus) zu beginnen. Nach einer weiteren Läufigkeit sollte im folgenden Diöstrus die Versuchsphase D (Diöstrus) durchgeführt werden. Der folgende Anöstrus mit nachfolgendem Diöstrus sollte den Kontrollphasen vorbehalten bleiben.

Retrospektiv zeigte sich jedoch, daß unmittelbar im Anschluß an die letzte Versuchsphase des A (Anöstrus) die ersten beiden in den Versuch aufgenommenen Hündinnen Sally und Jeani läufig wurden. Der Versuchsplan wurde daher dahingehend erweitert, daß bei Anzeichen von Läufigkeit während einer Versuchs- oder Kontrollphase A bei den weiter in den Versuch aufzunehmenden Tieren der für die Blutentnahmen vorgesehene Zeitraum erweitert wurde. Im Hinblick auf das obige Postulat, daß jede Versuchs- und Kontrollphase für sich steht, schien es gerechtfertigt, bei Lücken während des ersten Durchganges (Versuchsphasen A) diese im darauffolgenden Reproduktionszyklus, hier definiert als die Zeitspanne zwischen zwei Anöstren, durch Einschieben des entsprechenden Versuches zu schließen. Dies hatte zwangsweise zur Folge, daß bei den ersten beiden in den Versuch aufgenommenen Hündinnen die letzten Kontrollphasen in einem

dritten Reproduktionszyklus abgedeckt werden mußten. Eine chronologische Übersicht zur Versuchsdurchführung findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Chronologie der erhaltenen Versuchs- und Kontrollphasen

Hündin	Reproduktionszyklus											Kas- tra- tion		
	1				2					3				
Jeani	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub> (-L <sup>1)</sup> )		V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub> -L			K <sub>D</sub>		K-L	V <sub>Ka</sub>		
Sally		V <sub>A2</sub>	V <sub>A3</sub> (-L <sup>2)</sup> )		V <sub>D</sub>	V <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K-L		K <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>		V <sub>Ka</sub>	
Billi	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>	K-L		V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	V <sub>A3</sub> -L		K <sub>D</sub>			V <sub>Ka</sub>	
Lena	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>	V <sub>A3</sub> -L		V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K <sub>A3</sub>	K-L		K <sub>D</sub>			V <sub>Ka</sub>
Pebbels	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>	V <sub>A3</sub>	V <sub>A4</sub> -L	V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K <sub>A3</sub>	K <sub>A4</sub>	K-L	K <sub>D</sub>			V <sub>Ka</sub>

Legende: V<sub>A1-4</sub>: Versuchsphase Anöstrus; V<sub>D</sub>: Versuchsphase Diöstrus;

K<sub>A1-4</sub>: Kontrollphase Anöstrus; K<sub>D</sub>: Kontrollphase Diöstrus;

V<sub>A</sub>-L: Versuchsphase mit sich unmittelbar anschließender Läufigkeit;

K-L: Läufigkeit Kontrollphase; V<sub>Ka</sub>: Versuchsphase Kastration

<sup>1)</sup> Versuch nach den vorgesehenen 168h beendet; Beginn der proöstrischen Blutung am Tag 7, es wurde die Versuchsphase im 2<sup>ten</sup> Reproduktionszyklus ausgewertet

<sup>2)</sup> Versuch nach den vorgesehen 168h beendet; Beginn der proöstrischen Blutung am Tag 6. Die Läufigkeit wurde nicht mit ausgewertet (siehe Kapitel 4.1.1.2)

Ausgewertet wurden bei den 5 Hündinnen die in Tabelle 4 (Seite 57) angegebenen Versuchs- bzw. Kontrollphasen

### 3.2.2.1. Versuchsphasen

Versuch Anöstrus: Die erste Versuchsphase (V<sub>A1</sub>) begann eine Woche nachdem Progesteron auf Werte kleiner 1 ng/ml Plasma abgefallen war. Es schlossen sich weitere Versuchsphasen in 5 wöchigen Intervallen an. Die letzte Versuchsphase war die Phase

V<sub>A-L</sub>, bei der unmittelbar nach der Behandlung eine Läufigkeit auftrat. Abweichend von den Angaben in Kap. 3.2.2.5 erfolgten hier die Blutentnahmen in 8 stündigen Abständen, bis die parallel gemessenen Progesteronkonzentrationen Werte von > 3 ng/ml Plasma erreicht hatten. Dabei wurde unterstellt, daß damit die präovulatorische LH-Ausschüttung erfaßt wurde.

Versuch Diöstrus: Der Beginn der Versuchsphase (V<sub>D</sub>) wurde auf den 50. Tage nach Beginn der proöstrischen Blutung festgelegt.

### **3.2.2.2. Kontrollphasen**

Die Kontrollphasen (K<sub>A</sub>, K<sub>D</sub>) waren zeitpunktidentisch mit den Versuchsphasen, nur daß in diesen Phasen anstatt des mit Olivenöl verdünnten Arzneimittels ausschließlich das Vehikel (Olivenöl) verabreicht wurde.

In keinem Fall traten hier die Läufigkeiten im Anschluß an die Vehikelbehandlung auf, so daß sich jeweils eigene Blutentnahmephasen für die Läufigkeiten (K-L) ergaben. Der erste Tag der Blutentnahme war der sichtbare Beginn der proöstrischen Blutung. Die Blutentnahmen erfolgten auch hier in 8-stündigen Abständen bis zum unterstellten Ende des präovulatorischen LH-Peaks (s.o.).

### **3.2.2.3. Versuchsphase Kastration**

Alle Hündinnen wurden nach Abschluß der Versuchs- und Kontrollphasen kastriert. Die Versuchsphase Kastration wurde zwischen 6 bis maximal 8 Wochen nach Kastration gelegt. Die Blutentnahmen begannen hier 48 Stunden vor der ersten Injektion mit Estradiolbenzoat und erfolgten in 8 stündigen Intervallen. Der eigentliche Versuch wurde wie unter Kap 3.2.2.4 und 3.2.2.5 beschrieben durchgeführt.

### **3.2.2.4. Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$ und Vehikel**

Estradiol-17 $\beta$  wurde in Form des Arzneimittels Menformon K<sup>®</sup> (Firma Vemie Veterinär Chemie GmbH) herangezogen.

Dieses enthält 200 µg Estradiolbenzoat/ml  $\hat{=}$  144,7 µg Estradiol-17β/ml. Zur präziseren Dosierung wurde eine Verdünnung 1 mit Olivenöl hergestellt, so daß eine Endkonzentration von 40 µg Estradiolbenzoat/ml  $\hat{=}$  28,9 µg Estradiol-17β/ml vorlag. Unter Berücksichtigung der im Vorversuch 2 gewonnenen Ergebnisse (siehe Kap. 5.1) wurden in den Versuchsphasen für die Estradiolbenzoatapplikation folgende Zeitpunkte und Dosierungen gewählt.

Tag 1: 8<sup>00</sup> Uhr 1,0 µg Estradiolbenzoat/kg KGW sc

20<sup>00</sup> Uhr 1,5 µg Estradiolbenzoat/kg KGW sc

Tag 2: 8<sup>00</sup> Uhr 5,0 µg Estradiolbenzoat/kg KGW sc

Tag 3: 8<sup>00</sup> Uhr 5,0 µg Estradiolbenzoat/kg KGW sc

In den Kontrollphasen erfolgten zu den gleichen Zeitpunkten die Behandlungen mit dem Vehikel.

#### **3.2.2.5. Blutentnahmen und Konservierung der Plasmaproben**

Die Blutentnahmen bei den Versuchs- und Kontrollphasen erfolgten beginnend um 8<sup>00</sup> des ersten Tages der jeweiligen Versuchs- und Kontrollphase in 6-stündigen Intervallen bis zum Tag 2 um 8<sup>00</sup> und ab diesem Zeitpunkt in 8-stündigen Intervallen bis zum Ablauf von insgesamt 168 Stunden. Sofern Behandlungen und Blutentnahmen auf den gleichen Zeitpunkt fielen, erfolgte die Blutentnahme immer vor der Behandlung! Während der Läufe erfolgten die Blutentnahmen in 8-stündigen Intervallen.

Das Blut wurde durch abwechselnde Punktion der Vv saphenae oder den Vv cephalicae antebrachii mit sterilen Kanülen (Sterican 0,9 x 40 mm) gewonnen, in mit NH<sub>4</sub> - Heparin - präparierten Probenröhrchen (Fa. Sarstedt) aufgefangen und bis zur Zentrifugation (15 Minuten bei 1500g) im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt. Das Plasma wurde mittels Pasteurpipetten abgehebert und bis zur weiteren Untersuchung in Polypropylenröhrchen (Fa. Sarstedt) bei -20 °C tiefgefroren aufbewahrt.

### **3.2.3. Kontrolluntersuchungen**

#### **3.2.3.1. Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma**

Zur Bestimmung des Beginns des Anöstrus und der lutealen Funktion im Diöstrus wurde bei den Hündinnen nachdem sie in den Versuch genommen worden waren - bei allen Tieren geschah dies in Zyklusstadium des Diöstrus -, zwei bis drei mal wöchentlich zwischen 8<sup>00</sup> und 10<sup>00</sup> Uhr Blut gewonnen und die Progesteronkonzentration im Plasma bestimmt. Die Blutentnahmen endeten nach Beendigung der letzten Kontrollphase.

Während der Läufigkeiten und während der Kontroll- und Versuchsphasen im Diöstrus wurde in den täglichen 8<sup>00</sup> Uhr Proben Progesteron bestimmt.

#### **3.2.3.2. Bestimmung des elektrischen Widerstandes in der Vaginalschleimhaut**

Während der Behandlungsphasen und den Läufigkeiten wurde täglich zwischen 8<sup>00</sup> und 9<sup>00</sup> Uhr der elektrische Widerstand des Vaginalsekretes (Impedanzmessung) mit einem Detektor für Hündinnen (Fa. Draminiski, Olsztyn, Polen) gemessen. Die Meßsonde besteht aus einem 10 cm langen Hartplastikrohr mit einem Durchmesser von 0,5 cm, an dessen Ende sich zwei 0,4 cm breite Elektroden im Abstand von 0,5 cm befinden. Die Anzeige des gemessenen Wertes erfolgt digital. Der Meßbereich liegt zwischen 0 - 199 Ohm.

Die Meßsonde wurde so weit wie möglich in den cranialen Vaginalbereich vorgeschoben, mehrfach gedreht um eine vollständige Benetzung mit Vaginalschleim zu gewährleisten, danach wurde die Messung mittels Knopfdruck und Ablesen des Widerstandswertes vorgenommen.



### **3.3. Hormonanalytik**

#### **3.3.1. Bestimmung der Steroidhormone**

Zur Bestimmung der Hormone Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  kamen etablierte radioimmunologische Meßverfahren zur Anwendung.

##### **3.3.1.1. Bestimmung von Progesteron**

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an das von Hoffmann et al. (1973) beschriebenen Verfahren, wobei es sich um einen Gleichgewichtstest handelte.

###### **3.3.1.1.1. Testdurchführung**

Extraktion:

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt. Je nach Zyklusstand der Hündin wurden 0,025 ml (Ende Östrus bis Anfang Diöstrus), 0,05 ml (Mitte Diöstrus bis später Diöstrus) oder 0,1 ml (Anöstrus bis Mitte Östrus) Plasma der zu messenden Proben zur Probenaufbereitung in ein 16 ml Extraktionsröhrchen pipettiert und 2 mal jeweils über 15 min mit 2 ml Hexan im Rotationsmischer extrahiert. Nach jeder Extraktion wurden die Röhrchen zur Phasentrennung 1 min bei 1950g zentrifugiert, die wässrige Phase im Trockeneis-Alkoholbad über 30 sec bei -50 bis -60 °C eingefroren und anschließend der Überstand in Einweg-Reaktionsgefäße dekantiert. Das Lösungsmittel wurde im Vortex-Evaporator abgedampft (ca. 10 min bei 45 °C) und die Proben anschließend in 0,1 ml BSA-Phosphatpuffer rückgelöst.

Durchführung des RIA:

Die Durchführung erfolgte unter Ansatz der üblichen Referenzwerte [Gesamtaktivität (TOT), nichtspezifische Bindung (NSB)].

Die Eichkurve, angesetzt in BSA-Phosphatpuffer, deckte den Bereich von 0,025–1,5 ng pro Ansatz (0,1ml) ab. Als Tracer wurde 44,8 pg <sup>3</sup>H-Pogesteron  $\hat{=}$  24000 dpm, aufgenommen in 0,1 ml BSA-Phosphatpuffer, zugegeben. Nach Hinzufügen der

Antiserumverdünnung (0,4 ml) wurden die Proben „en bloc“ geschüttelt, dann zunächst im Wärmeschüttelbad über 20 min bei 37°C und anschließend für mindestens 1 Stunde im Eiswasserbad bei 4°C inkubiert. Die Trennung von freiem und gebundenem Progesteron erfolgte durch Adsorption an Holzkohle. Dazu wurde den Proben 0,2 ml eiskühle 0,5%-ige Holzkohlesuspension zugegeben, diese dann über 10 min bei 4 °C stehen gelassen und anschließend über 15 min bei 2220 g und 4°C zentrifugiert. Zur Messung der antikörpergebundenen Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler wurden 0,6 ml des Überstandes mit einem Diluter-Dispenser dekantiert und unter Nachspülen mit 3 ml Scintillationsflüssigkeit in Scintillationsküvetten überführt. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte im On-line Verfahren mit dem von der Fa. Beckman bereitgestellten Programm (Linearisierung nach Logit/Log-Transformation).

#### **3.3.1.1.2. Zuverlässigkeit**

Bei der Überprüfung der Zuverlässigkeit ergab sich ein Intraassayvariationskoeffizient zwischen 8,8% und 9,6 % (n=15). Der Interassayvariationskoeffizient lag bei 8,9% (n=31).

#### **3.3.1.2. Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$**

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an den von Hoffmann et al. (1992) beschriebenen Sequenztest.

##### **3.3.1.2.1. Testdurchführung**

Extraktion:

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt. Es wurden 0,25 ml der zu messenden Proben in 16 ml Extraktionsröhrchen pipettiert und 2 mal mit 2,5 ml Toluol über 15 min im Rotationsmischer extrahiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Extraktion von Progesteron.

Durchführung des RIA:

Zur Definition der nichtspezifische Bindung (NSB) wurde dem 0-Wert der Standardkurve ein 312-facher Überschuß von Estradiol-17 $\beta$  (10 ng) zugesetzt.

Die Eichkurve, angesetzt in BSA-Phosphatpuffer, deckte den Bereich von 0,5–32 pg pro

Ansatz (0,1 ml) ab. Nach Zugabe der Antiserumverdünnung (0,4 ml) erfolgte die erste Inkubation über Nacht bei 4°C. Zur Fortführung des Tests wurde 32 pg <sup>3</sup>H-markiertes Estradiol-17β (0,1 ml)  $\hat{=}$  24000 dpm in BSA-Phosphatpuffer zugegeben und die Proben über weitere 45 min bei 4°C inkubiert.

Die Trennung von freiem und gebundenen Estradiol-17β erfolgte durch Adsorption an Holzkohle. Dazu wurde den Proben 0,2 ml eisgekühlte 0,5%-ige Holzkohlesuspension zugegeben, diese dann über 30 min bei 4 °C stehen gelassen und anschließend über 15 min bei 2220 g und 4°C zentrifugiert. Zur Messung antikörpergebundener Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler wurden 0,6 ml des Überstandes mit einem Diluter-Dispenser dekantiert und unter Nachspülen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsküvetten überführt. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte im On-line Verfahren mit dem von der Fa. Beckman bereitgestellten Programm (Linearisierung nach Logit/Log-Transformation).

#### **3.3.1.2.2. Zuverlässigkeit**

Bei der Überprüfung der Zuverlässigkeit ergab sich für den Meßpunkt 5 pg/0,25 ml ein Intraassayvariationskoeffizient von 7,68 % und für den Meßpunkt 15 pg/0,25ml ein Intraassayvariationskoeffizient von 6,51 % . Die Interassayvariationskoeffizienten lagen bei 18,16 % (5 pg/0,1ml) und 17,06 % (15 pg/0,1ml).

#### **3.3.1.3. Spezielle Reagenzien und Geräte zur Bestimmung von Progesteron und Estradiol-17β**

##### Standardsubstanzen

Progesteron: 4-Pregnen-3,20-dion (Fa. Serva)

Stammlösung: 10 mg in 10 ml Methanol reinst

alle weiteren Verdünnungen erfolgten in BSA-Phosphatpuffer

Estradiol-17β: 1,3,5(10)-Estratriene-3-17β-diol (Serva).

Stammlösung: 10 mg in 10 ml Methanol reinst

alle weiteren Verdünnungen erfolgten in BSA-Phosphatpuffer

### <sup>3</sup>H-markiertes Hormon

Progesteron: 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-4-Pregnen-3,20-dion [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]:

Spezifische Aktivität: 82 Ci/mmol = 2,97 TBq/mmol (Fa. Amersham Buchler GmbH Braunschweig);

Aufnahme von 250 µCi in 10 ml Methanol. Als radioaktiver Tracer wurden im RIA ca. 7200 cpm = 24000 dpm  $\hat{=}$  44,8 pg bzw. 142,4 fmol/ 0,1ml BSA-Phosphatpuffer eingesetzt.

Estradiol-17 $\beta$ : 1,3,5,(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol,[2,4,6,7-<sup>3</sup>H(N)]

Spezifische Aktivität: 94 Ci/mmol = 3,5 TBq/mmol (Fa. Amersham Buchler GmbH, Braunschweig).

Aufnahme von 250 µCi in 10 ml Methanol. Als radioaktiver Tracer wurden im RIA ca. 7200 cpm = 24000 dpm  $\hat{=}$  32 pg bzw. 117,4 fmol/ 0,1ml BSA-Phosphatpuffer eingesetzt.

### Antiseren

Progesteron: Das eingesetzte Antiserum (Bezeichnung: GI-P4-IV vom 15.9.1986), gewonnen nach wiederholter Immunisierung von Kaninchen mit 11 $\alpha$ -OH-Progesteron-Hemisuccinat-BSA (Fa. Paesel), wurde in einer Verdünnung von 1:50000, d.h. einer Endverdünnung von 1:75000, eingesetzt. Die Assoziationskonstante  $K_a$  lag bei  $4,42 \times 10^9$  l/Mol. Die Spezifität des Antiserums ergibt sich aus den in Tabelle 2 wiedergegebenen Kreuzreaktionen mit anderen Steroiden.

Tabelle 2: Radioimmunotest zur Bestimmung von Progesteron:

Kreuzreaktionen unterschiedlicher Steroide mit dem Antiserum Gi-P4-IV

Steroid	Kreuzreaktion
Progesteron	100,00 %
Androstendion	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
Estradiol-17 $\beta$	< 0,01 %
Estron	< 0,01 %
Cortisol	< 0,01 %
Testosteron	0,37 %
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon	< 0,01 %
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	0,49 %
Pregnenolon	0,69%

Estradiol-17 $\beta$ : Das eingesetzte Antiserum (Gi-E2 $\beta$ -Pool Kaninchen I vom 29.4.1986), gewonnen nach wiederholter Immunisierung von Kaninchen mit 1,3,5(10)Estratrien-3,17 $\beta$ -diol 6-0-carboxy-methyloxim-BSA (Fa. Paesel), wurde in einer Verdünnung von 1:17000, d.h. einer Endverdünnung von 1:25500, eingesetzt. Die Assoziationskonstante  $K_a$  lag bei  $11,19 \times 10^9$  l/Mol.

Wie Tabelle 3 zeigt, lag eine hohe Spezifität für Estradiol-17 $\beta$  vor.

Tabelle 3: Radioimmunotest zur Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$ :  
Kreuzreaktion unterschiedlicher Steroide mit dem Antiserum Gi- E2 $\beta$ -Pool  
Kaninchen I

Steroid	Kreuzreaktion
Androstendion	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
Estron	1,30 %
Estriol	0,68 %
Cortisol	< 0,01 %
Testosteron	< 0,01 %
17 $\alpha$ -Dihydrotestosteron	< 0,01 %
Progesteron	< 0,01 %

#### 3.3.1.4. Herstellung der Pufferlösungen

##### *Phosphatpuffer*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Fluka)	5,372	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Merk)	16,712	g
NaN <sub>3</sub>	(Merk)	0,650	g
Aqua dest.		ad 2000,0	ml

##### *BSA-Phosphatpuffer*

Bovines Serumalbumin (Sigma)	1,0	g
Phosphatpuffer	ad 1000,0	ml

### 3.3.1.5. Herstellung der Kohlesuspension

Norit A	2,50	g
Dextran 60	0,25	g
Aqua dest ad	500,0	ml

### 3.3.1.6. Materialien und Geräte

- Einweg Reaktionsgefäße 5 ml; 75\*11,5 mm (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
- Varifuge K (Fa. Heraeus, Osterode i.H.)
- Extraktionsgläser; 16 ml Gewindegläser mit Schraubverschlüssen (Fa. Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt)
- Schraubverschlüsse mit Aluminiumfolie (Fa. Zinsser Analytik, Frankfurt)
- Scintillationsküvetten; 6 ml Zinsser Minis 2000 (Fa. Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt)
- Vortex-Evaporator (Fa. Haake-Buchler Meßtechnik GmbH, Karlsruhe)
- Rotationsmischer und Vortex-Mischer (Fa. Heidolph-Elektro GmbH, Kelkheim)
- Dispenser-Diluter (Fa. Hamilton, Darmstadt)
- Scintillationsflüssigkeit: aqua safe 300 plus (Fa. Zinsser Analytik, Frankfurt)
- Flüssigkeitsscintillationszähler LS 5000 TD mit On-line Auswertungsprogramm (Fa. Beckman, München)

### 3.3.2. Radioimmunologische Bestimmung von Luteinisierendem Hormon (LH)

Die Bestimmungen wurden in Zusammenarbeit Prof. Dr. D. Schams, Institut für Physiologie im Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel - Technische Universität München, Freising - Weihenstephan durchgeführt. Es handelte sich dabei um einen speziell für canines LH modifizierten heterologen RIA, der ursprünglich zur Bestimmung von bovinem LH entwickelt worden war.

Als Standard wurde canines LH eingesetzt, der erste Antikörper war gegen canines LH gerichtet, als Tracer diente  $^{125}\text{I}$  markiertes bovines LH. Der Test wurde als Sequenztest angesetzt.

### 3.3.2.1. Markierung von bovinem LH mit $^{125}\text{I}$

Bovines LH wurde mittels einer modifizierten Chloramin-T-Methode nach Hunter und Greenwood (1962) und Greenwood et al. (1963) markiert. Bei diesem Verfahren wird das als Natriumjodid vorliegende Isotop mittels Chloramin-T oxidiert. Das entstandene freie  $^{125}\text{I}$  wird in die Tyrosinreste des LH eingebaut. Die Reaktion wird mittels Natriumdisulfit zur Reduktion von Chloramin-T gestoppt.

#### 3.3.2.1.1. Vorbereitung zur Markierung

Säule: Eine 2 ml Säule wurde auf 1 cm mit Anionenaustauscher Harz, 50-100 mesh, chlorierte Form (Fa. Bio Rad) gefüllt und bis zur Verwendung kühl und dunkel aufbewahrt.

Kurz vor dem eigentlichen Markierungsvorgang wurde die Säule der Reihe nach mit

- 1 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH = 7,5
- 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH = 7,5
- 1 ml 1% BSA-Puffer pH = 7,5
- 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH = 7,5

vorgespült.

Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pasteurpipetten: Das Eppendorf-Reaktionsgefäß (s.S. 54) und die Pasteurpipetten (s.S. 54) wurden mit Serva Silicon Lösung gespült, so daß eine vollständige Benetzung gewährleistet war. Anschließend wurden die siliconisierten Teile im Trockenschrank bei 40°C über Nacht getrocknet.

#### 3.3.2.1.2. Durchführung der Markierung mit $^{125}\text{I}$

In ein siliconisiertes Eppendorfgefäß wurden zu 10 µg bovinem LH, aufgenommen in 10 µl Phosphatpuffer, 25 µl ( $=7,4 \cdot 10^6$  Bq)  $^{125}\text{I}$  in Form von Natriumjodid pipettiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Chloramin-T gestartet und das Reaktionsgefäß 20 sec geschüttelt, wonach 100 µl Natriumdisulfit und 200 µl KI zum Abstoppen der Reaktion zugegeben wurden. Mit einer Pasteurpipette wurde zunächst das Reaktionsgemisch und dann die zum Nachspülen des Eppendorf-Reaktionsgefäßes verwendeten 0,2ml 0,5 M Phosphatpuffer auf die vorbereitete Säule aufgetragen.



Anschließend wurden 2 ml Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde in einem 20 ml Probengefäß aus Glas aufgefangen und anschließend in Aliquoten zu 500 µl bei - 20°C eingefroren.

### **3.3.2.2. Testdurchführung**

Der Test erstreckte sich über 5 oder 6 Tage, wobei sich die zeitliche Variation aus der zwischen 48 und 72 Stunden liegenden Dauer der Tracerinkubation ergab; diese Schwankungen blieben ohne Auswirkungen auf das Testergebnis.

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt, die Eichkurve umfaßte 8 Konzentrationen von 0,05 bis 2,0 ng canines LH/ml 0,05 M Phosphatpuffer.

Zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Tests wurden biologische Kontrollen mit bekannt hohem und bekannt niedrigem Wert eingefügt.

Durchführung des RIA:

Der Test wurde in 3,5 ml Einweg-Reagenzröhrchen angesetzt.

erste Inkubation: Die Punkte der Standardkurve wurden für jeden Test neu in 100 µl 0,05 M Phosphatpuffer angesetzt. Es erfolgte eine Volumenauffüllung auf 200 µl mit Albumin-Phosphatpuffer. 0,2 ml Proben- bzw. Kontrollplasma wurden mit einem Dispenser einpipettiert. Erster Antikörper - Verdünnung und Kaninchen-Null-Serum in Albumin-Phosphatpuffer (s.S. 55) und in Albumin-Phosphatpuffer verdünntes LH freies Rinderplasma (s.S. 55) wurden im Verhältnis 1:1:2 vermengt und 0,2 ml dieses Gemisches/Probe wurden zugegeben.

Die Ansätze wurde über 24 h bei + 4° C inkubiert.

zweite Inkubation: Zu allen Ansätzen wurden 0,1 ml Tracerlösung zugegeben. Die Aktivität betrug 10000 cpm/Ansatz.

Der Test wurde weitere 48 bis 72 Stunden bei + 4°C inkubiert.

dritte Inkubation: 0,1 ml der 2. Antikörperverdünnung wurde zu allen Ansätzen außer der TOT (Totale: Pro Ansatz eingesetzte

Menge an I <sup>125</sup>) zugegeben.

Der Test wurde nochmals über 24 h bei + 4°C inkubiert.

Testende: Zu jedem Ansatz (außer der TOT) wurden 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer pipettiert, unmittelbar anschließend wurden die Röhrchen bei 1200 g zentrifugiert, folgend dekantiert und im Gammazähler gemessen.

### **3.3.2.3. Auswertung**

Die Auswertung erfolgte im On-line Verfahren über das dem Counter angeschlossene Programm der Firma Berthold. Unter Beachtung der Totalaktivität, der NSB-korrigierten Werte sowie der relativen Bindung erfolgt die Darstellung der Standardkurve für die Konzentration (x-Achse) logarithmisch, die prozentuale Bindung linear. Nach der Hochrechnung der Ergebnisse erfolgte die Ausgabe der Meßergebnisse in ng/ml Plasma.

### **3.3.2.4. Qualitätskriterien des Tests**

Die durchschnittlich erreichte Verdrängung bei 2 ng LH/ml Puffer lag bei 90 %. Alle Proben mit Werten über 2 ng LH/ml wurden verdünnt und nochmals bestimmt. Der Intraassayvariationskoeffizient lag bei einer Konzentration von 0,83 ng LH/ml Plasma bei 5,9% und bei 1,72 ng LH/ml Plasma bei 3,5 %. Der Interassayvariationskoeffizient betrug bei 0,12 ng LH/ml Plasma 9,1 %, bei 0,36 ng LH/ml Plasma 9,2 %, bei 0,458 ng LH/ml Plasma 6,0 % und bei 2,423 ng LH/ml Plasma 2,8 %. Die Wiederfindung betrug bei 0,5 ng LH/ml Plasma 95,6 % (n=20) und bei 1,5 ng LH/ml Plasma 91,5 % (n=20).

### **3.3.2.5. Substanzen und Materialien zur Markierung**

- <sup>125</sup>I als Natriumjodid in NaOH-Lösung, pH 7-11 (Fa. Amersham)
- Chloramin-T, p.a. (Fa. Sigma):  
10 mg Chloramin-T in 10 ml 0,05 M PO<sub>4</sub> -Puffer
- Natriumdisulfit, p.a. (Fa. Merk):  
10 mg Natriumdisulfit in 10 ml 0,05 M PO<sub>4</sub> -Puffer

- Kaliumjodid, p.a. (Fa. Merk):  
10 mg Kaliumjodid in 1 ml 0,05 M  $\text{PO}_4$  -Puffer
- Säule:  
2 ml Filtration Column (Fa. J.T. Baker)
- Anionenaustauscher:  
Analytical Grade Anion exchange Resin 50-100 mesh chloride Form (Fa. Bio-Rad)
- Silicon solution, p.a. (Fa. Serva)
- Pasteurpipetten 150 mm (Fa. Brand)
- Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)

### **3.3.2.6. Standardsubstanzen, Antisera und unspezifische Zusätze**

- Canines LH: Verwendet wurde für diesen Test gereinigtes canines LH (AFP 5216 B)  
Verdünnung in Albumin-Phosphat-Puffer.
- Bovines LH für die Markierung: Verwendet wurde gereinigtes bovines LH (DSA 19.7.94).  
Für die Herstellung der Tracerlösung wurde das markierte Hormon in Albumin-Phosphatpuffer verdünnt
- 1. Antikörper: Für diesen Test wurde ein aus dem Kaninchen gewonnenes spezifisch gegen canines LH gerichtetes Antiserum verwendet (AFP 8311 890). Die Endverdünnung lag bei 1:240 000.
- 2. Antikörper: Der verwendete 2. Antikörper war ein vom Schaf gewonnener Antikörper gegen Kaninchen IgG (Karl 23.2.95). Er wurde in der Endverdünnung von 1:60 eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Albumin-Phosphatpuffer.
- Kaninchen-Null-Serum: Das Serum nicht immunisierter Kaninchen (Bezeichnung: 10/95) wurde in einer Endverdünnung von 1:1200 eingesetzt.
- LH-freies Rinderplasma: Das Plasma (Bezeichnung: RP-Kaligo vom 20.2.89) wurde in einer Endverdünnung von 1: 30 eingesetzt

### 3.3.2.7. Puffer

#### Phosphatpuffer 0,5 M pH=7,5

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	74,48 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11,17 g	
NaCl	11,69 g	
Aqua dest	ad 1000,00 ml	auf pH = 7,5 einstellen

#### Albumin-Phosphat-Puffer 0,05 M pH=7,5

BSA	1,00 g	
Titriplex III	3,60 g	
Phosphatpuffer 0,5 M pH=7,5	200,00 ml	
Aqua dest	ad 2000,00 ml	

#### Auswertepuffer 0,05 M pH=7,5

Phosphatpuffer 0,5 M pH=7,5	100,00 ml	
Aqua dest	ad 1000,00 ml	

#### Elutionspuffer:

BSA	1,00 g	
Auswertepuffer 0,05 M pH=7,5	ad 100,00 ml	

### 3.3.2.8. Materialien und Geräte

- RIA-Röhrchen: Einweg-Reagenzröhrchen, 3,5 ml, 55x22 mm (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
- Dispenser: Hamilton Micro Lab 1000
- Zentrifuge: Sigma 4-K-1
- Gamma-Counter: Berthold LKB-Wallac 1277 Gammamaster, Automatic Gamma Counter

#### 4. Auswertung

Grundlage der vergleichenden Auswertung waren die bei den einzelnen Hündinnen erhaltenen Versuchs- und Kontrollphasen wie in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Bei den einzelnen Hündinnen erhaltene Versuchs- und Kontrollphasen (siehe auch Tabelle 1 Seite 41)

Name	Versuchsphasen					Kontrollphasen					Kas- tration	
Jeani	V <sub>A1</sub>			V <sub>A-L</sub>	V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>			K-L	K <sub>D</sub>	V <sub>Ka</sub>	
Sally	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>		V <sub>A-L</sub> <sup>1)</sup>	V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>		K-L	K <sub>D</sub>	V <sub>Ka</sub>	
Billi	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>		V <sub>A-L</sub>	V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>		K-L	K <sub>D</sub>	V <sub>Ka</sub>	
Lena	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>		V <sub>A-L</sub>	V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K <sub>A3</sub>		K-L	K <sub>D</sub>	V <sub>Ka</sub>
Pebbels	V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>	V <sub>A3</sub>	V <sub>A-L</sub>	V <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K <sub>A3</sub>	K <sub>A4</sub>	K-L	K <sub>D</sub>	V <sub>Ka</sub>

Legende: siehe Tabelle 1 Seite 41

Aufgrund des unterschiedlichen Stichprobenvolumens wurde die statistische Auswertung mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon 1993) durchgeführt.

Zur Anwendung kam die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse. Dabei konnten mangels ausreichenden Stichprobenumfangs im späten Anöstrus nicht alle Phasen berücksichtigt werden.

Des weiteren wurde eine Trendanalyse (Steigungsberechnung) für den Hormonverlauf in den Versuchsphasen K<sub>A</sub>, V<sub>A</sub> und V<sub>Ka</sub> mittels Einstichproben t-Test durchgeführt. Das Programmpaket Microsoft Excel 97 SR-1 wurde für die Auswertung der Versuchsphasen mit einheitlichem Stichprobenvolumen eingesetzt. Welches Programm mit welcher statistischen Auswertung verwendet wurde, ist im jeweiligen Kapitel angegeben.

Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF), dargestellt in der Form  $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$ ,

vorgenommen.

Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personal Computer mit dem Programm Microsoft Excel 97 SR-1 erstellt.

#### **4.1. Hormone**

##### **4.1.1. Luteinisierendes Hormon (LH)**

###### **4.1.1.1. Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung**

Für jede Blutentnahmeperiode (Versuchsphase, Kontrollphase, Versuchsphase Kast-ration) wurden folgende Parameter erfaßt:

- a) Maximalwerte der LH-Freisetzung (in ng/ml)
- b) AUC: Die AUC wurde nach folgender Formel berechnet:  $\text{Zeitintervall} \times \frac{\sum(\text{0h Wert} + \text{168h Wert})}{2}$ . Die AUC gilt als Maß für die Ausschüttung eines Hormons über einen Zeitraum (in ng/ml\*h).
- c) Basalwerte: Die Basalwerte wurden wie bei Hoffmann und Schneider (1993) beschrieben errechnet. Aus den Werten einer Blutentnahmeperiode wurde der arithmetische Mittelwert errechnet sowie die Standardabweichung; alle Werte die über dem Mittelwert plus doppelter Standardabweichung lagen, wurden aus der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle Werte innerhalb des Bereiches von  $\bar{x} + 2 \text{ SD}$  lagen (in ng/ml).
- d) Anzahl der Peaks: Als Hinweis für einen Peak wurden Werte größer  $\bar{x} + 2\text{SD}$  gewertet. Anders als bei Hoffmann und Schneider (1993) beschrieben, können diese im Hinblick auf die Halbwertszeit von ca. 15 min für LH beim Hund (Schneider 1993) und das vorgegebene Blutentnahmeintervall von 6-8 Stunden jedoch nicht mit der Amplitudenhöhe gleichgesetzt werden.
- e) Auftreten des ersten Peaks nach Behandlungsbeginn (in Stunden).

###### **4.1.1.2. Auswertung der Versuchs- und Kontrollphasen**

Für alle Versuchs- und Kontrollphasen wurden die oben angegebenen Parameter a bis e ermittelt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (s.o.) über die Faktoren Zeit (globaler Zeiteffekt im Mittel über beide Gruppen) und Behandlung (mit oder ohne Behandlung). In diese Analyse wurden die Versuchs- und Kontrollphasen D, A1 und A2 einbezogen. Des weiteren wurde für die Versuchsphasen im Anöstrus ( $V_{A1}$ ,  $V_{A2}$ ,  $V_{A3}$  und  $V_{A-L}$ ) die Trendanalyse durchgeführt.

Bei den Versuchsphasen mit sich unmittelbar anschließender Läufigkeit wurde unbeschadet der längeren Blutentnahmeperiode für diese Auswertung zunächst nur der reguläre Zeitraum von 168 Stunden einbezogen (siehe Kap. 3.2.2.5).

#### **4.1.1.3. Auswertung der Läufigkeiten während der oder unmittelbar im Anschluß an die Versuchsphasen und spontan aufgetretener Läufigkeiten**

Es wurde die Zeitspannen vom Beginn des Proöstrus bis zum Beginn der Duldung bzw. bis zum Beginn des Progesteron-Anstiegs erfaßt und miteinander verglichen. Zur Charakterisierung des präovulatorischen LH-Gipfels wurden folgende Meßgrößen erfaßt:

- a) Zeitspanne Beginn Läufigkeit – Beginn LH-Gipfel
- b) Dauer LH-Gipfel, definiert als der Zeitraum, in dem die dem Peak zugeordneten LH-Werte über der errechneten basalen LH-Ausschüttung liegen
- c) AUC des LH-Gipfels.

Der statistische Vergleich erfolgte mittels gepaartem t-Test (Excel)

Die Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion, gemessen an der AUC, wurde für den Zeitraum vom Beginn des Proöstrus bis zum Beginn der Duldung bzw. bis zum Beginn des Progesteron-Anstiegs bestimmt. Der statistische Vergleich erfolgte mittels gepaartem t-Test (Excel).

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde für die weitere Auswertung der Zeitpunkt der maximal gemessenen LH-Konzentration als Zeitpunkt (Stunde) 0 gesetzt. Die unter Kap. 4.1.1.1 angegebenen Parameter b) AUC und c) Basalwert wurden für den Zeitraum von -112 bis +56 Stunden ermittelt und mittels gepaartem t-Test verglichen (Excel).

Der Zeitraum vom Maximum des LH-Peaks bis zur Ovulation (Progesteron >5 ng/ml im peripheren Plasma) wurde ebenfalls erfaßt; der Gruppenvergleich erfolgte mittels gepaartem t-Test (Excel).

#### **4.1.1.4. Kastration**

Die Auswertung des Verlaufs der LH-Konzentrationsänderungen im Plasma erfolgte zum einen mittels 1-facher Varianzanalyse mit Meßwiederholung im Faktor Zeit der gemessenen LH-Konzentrationen (BMDP).

Als Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung wurden des weiteren die Maximalwerte, die AUC sowie die Basalwerte herangezogen (siehe Kap. 4.1.1.1) und im gepaarten t-Test verglichen (Excel). Entsprechend des Verlaufs von LH wurde der Beobachtungszeitraum für die weitere Auswertung in vier 48-Stundenintervalle unterteilt:

- a) -48 – 0 Stunden;
- b) 0 – 48 Stunden;
- c) 48 – 96 Stunden;
- d) 96 - 144 Stunden.

#### **4.1.2. Estradiol-17 $\beta$**

##### **4.1.2.1. Definition der Verlaufskurve nach einmaliger Injektion von Estradiol-17 $\beta$ (Vorversuche)**

Die Estradiol-17 $\beta$  Verlaufskurve wurde durch die Erfassung von  $t_{\max}$  und  $c_{\max}$  charakterisiert. Weiterhin wurde der Zeitraum erfaßt, an dem das Ausgangsniveau wieder erreicht war.

##### **4.1.2.2. Definition der Verlaufskurve nach mehrmaliger Injektion von Estradiolbenzoat (Hauptversuche)**

Die zu den einzelnen Meßzeitpunkten erhaltenen Werte wurden für die  $V_{A1}$ - $V_{A3}$  sowie, getrennt davon, für die  $V_{Ka}$  gemittelt ( $\bar{x}_g * Sf^{\pm 1}$ ), des weiteren wurden die Estradiol-17 $\beta$  Werte eines entsprechenden Zeitraums der Läufe der Kontrollphase ge-



mittelt ( $\bar{x}_g * Sf^{\pm 1}$ ). Zum Vergleich des Kurvenverlaufes wurde eine Korrelationsberechnung zwischen den ermittelten Kurven durchgeführt (Excel). Es wurden die AUC, die erreichten Maximalwerte und bei den Versuchsphasen der Zeitpunkt des Erreichens der Maximalwerte und die Rückkehr auf Basalniveau nach der letzten Injektion berechnet und mittels gepaartem t-Test (Excel) verglichen.

#### 4.1.2.3. Definition der Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion während der Kontrollphasen

Zur Quantifizierung der Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion während der Kontrollphasen ( $K_{A1}$  -  $K_{A4}$  und  $K_D$ ) wurden die AUC, die Basalkonzentrationen, die Maximalwerte sowie die Anzahl der Peaks bestimmt (siehe Kap. 4.1.1.1). Die statistische Analyse erfolgte in Form einer einfachen Varianzanalyse über den Faktor Zeit (BMDP).

Des weiteren wurde für die Werte im Anöstrus eine Trendanalyse (Steigungsberechnung) durchgeführt (siehe Kap. 1).

#### 4.1.3. Progesteron

Aus dem Verlauf der Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma wurden folgende Daten abgeleitet

- a) Länge des Diöstrus (Ende der sexuellen Akzeptanz bis Progesteron < 1 ng/ml) nach  $V_A$ -L und K-L in Tagen (der Vergleich zwischen den Diöstren erfolgte mittels gepaartem t-Test).
- b) Länge des Anöstrus (ab Progesteron < 1 ng/ml bis Beginn proöstrische Blutung) der Versuchs- und Kontrollphasen (der Vergleich zwischen den Anöstren erfolgte mittels gepaartem t-Test).
- c) Der Zeitpunkt des Übergangs vom Proöstrus in den Östrus (Progesteronanstieg von < 1 mg/ml auf > 1 ng/ml mit nachfolgend steigender Tendenz).
- d) Der ungefähre Ovulationszeitpunkt (Tag 0: Progesteron > 5 ng/ml).

Als Maß für die Progesteronsekretion im Diöstrus nach vorangegangener Läufigkeit in der Versuchs- ( $V_A$ -L) bzw. Kontrollphase (K-L) wurde die AUC vom Tag 0 (Tag der Ovulation) bis zum Tag 34 nach der Ovulation bestimmt, an dem bei einigen Hündinnen

der Beginn der Versuchs- bzw. Kontrollphase lag. Die erhaltenen Werte wurden mittels gepaartem t-Test verglichen.

Die in den Versuchs- und Kontrollphasen des Diöstrus für die jeweiligen Zeitpunkte ermittelten Progesteronkonzentrationen wurden mittels gepaartem t-Test verglichen. Des weiteren wurde die AUC für den Zeitraum 0 bis 192 Stunden nach der ersten Injektion bestimmt und mittels gepaartem t-Test verglichen.

#### **4.2. Vaginaler Widerstand**

Für die Versuchsphasen ( $V_{A1}$  -  $V_{A3}$ ,  $V_D$  und  $V_{Ka}$ ) wurde für die einzelnen Meßpunkte der geometrische Mittelwert mit Streufaktor ( $\bar{x}_g * Sf \pm 1$ ) errechnet und eine mittlere Verlaufskurve dargestellt. Zur Quantifizierung des vaginalen Widerstandes während der Versuchsphasen wurden die AUC und die Maximalwerte bestimmt (siehe Kap. 4.1.1.1). Die statistische Analyse erfolgte in Form einer einfachen Varianzanalyse mit Meßwiederholung im Faktor Zeit (BMDP).

Des weiteren wurden die Parameter AUC und Maximalwerte in den ersten 168 Stunden der Läufe VA-L und K-L bestimmt und mittels gepaartem t-Test verglichen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Vorversuche: Induzierte Estradiolverlaufskurve

Die im Rahmen von Vorversuch a) nach einer einzelnen Injektion mit Estradiol-17 $\beta$  (4 $\mu$ g/kg KGW) entstandene mittlere Verlaufskurve im peripheren Plasma ist in Abb. 4 dargestellt. Die Maximalwerte( $c_{\max}$ ) lagen im Mittel bei  $295,8 \pm 89,1$  pg/ml Plasma und wurden nach  $3,2 \pm 1,1$  Stunden ( $t_{\max}$ ) erreicht, nach  $24 \pm 5,66$  Stunden waren die Basalwerte wieder erreicht.

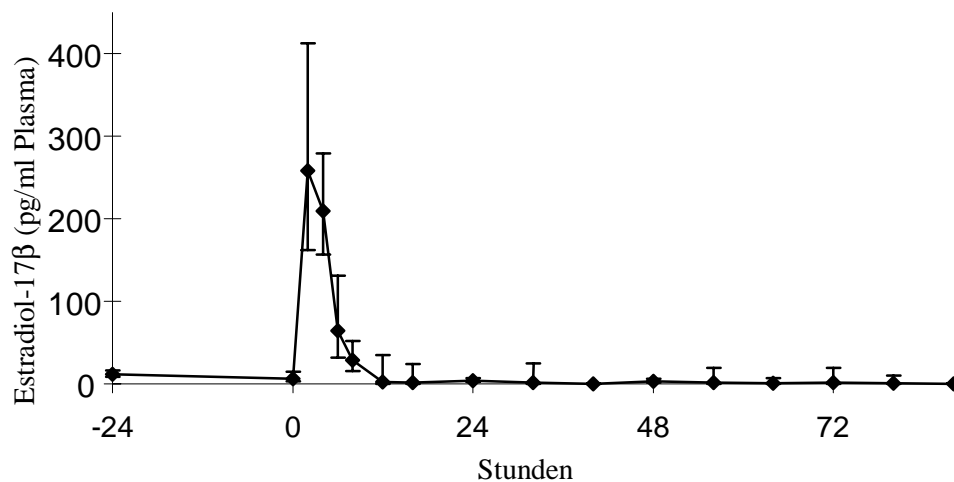


Abb. 4.: Estradiol-17 $\beta$  Verlauf im Plasma nach Injektion von 4  $\mu$ g Estradiol-17 $\beta$ /kg KGW ( $\bar{x}_g \pm SF^{\pm 1}$ ; n=7) (0 = Zeitpunkt der Behandlung)

Die in Vorversuch b) bei 2 Hunden erhaltene Verlaufskurve zeigt Abb. 5. Anders als bei Vorversuch a) entspricht die in Vorversuch b erhaltene Kurve in etwa der Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung im Proöstrus. Für den Hauptversuch wurde daher dieses Dosierungsschema weitgehend beibehalten (s. Seite 43, Kapitel 3.2.2.4).

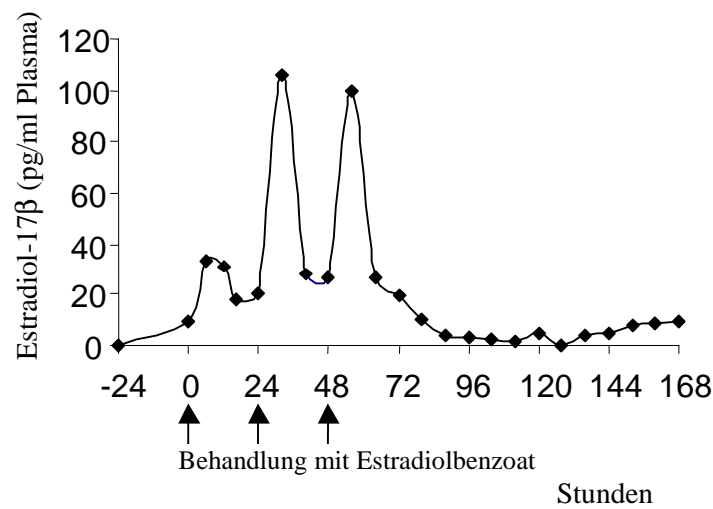


Abb. 5: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$  Konzentrationen im Plasma nach Injektion von Estradiolbenzoat

## 5.2. Hauptversuche

### 5.2.1. Induzierte Estradiolverlaufskurve

Für die während der Versuchsphasen A erhaltenen Verlaufskurven wurde eine mittlere Verlaufskurve ( $\bar{x}_g$ ) errechnet. Getrennt davon wurde die mittlere Verlaufskurve ( $\bar{x}_g$ ) für die Versuchsphasen Kastration errechnet. Dies erfolgte, um auf mögliche Überlagerungen durch endogenes Estradiol-17 $\beta$  schließen zu können. Das Ergebnis ist in Abb. 6 wiedergegeben, in der auch die für die spontanen Läufigkeiten (K-L) ermittelte mittlere Verlaufskurve eines vergleichbaren Abschnitts der proöstrischen Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung dargestellt ist.

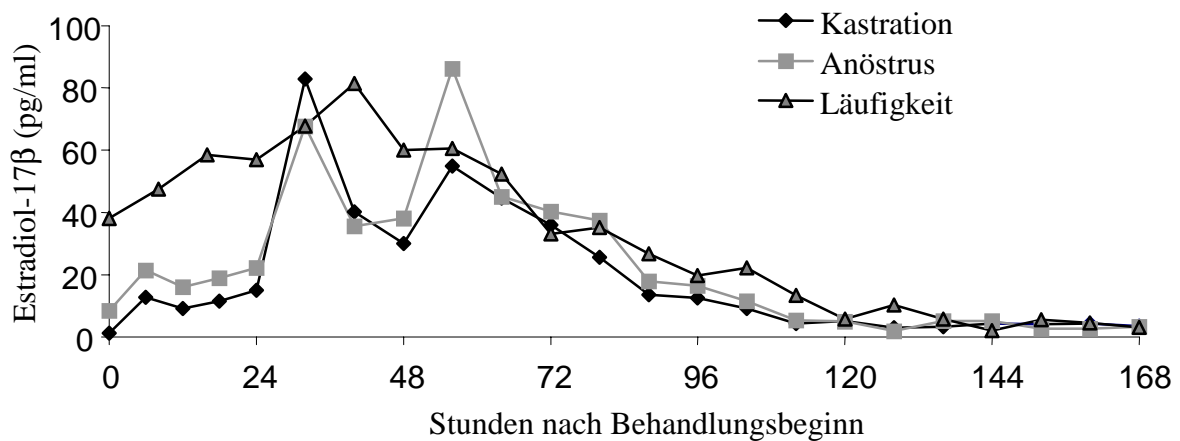


Abb. 6: Verlaufskurve von Estradiol-17 $\beta$  ( $\bar{x}_g$ ) für die Versuchsphasen (Anöstrus, nach der Kastration und während der Läufigkeit)

Wie Abb. 6 zeigt, resultierte aus der Behandlung mit Estradiolbenzoat eine dem proöstrischen Estradiolverlauf vergleichbare Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung. Der Korrelationskoeffizient der Verlaufskurven lag bei 0,93 zwischen „Anöstrus“ und „Kastration“ und 0,79 zwischen „Läufigkeit“ und „Anöstrus“ bzw. „Kastration“. Über einen Zeitraum von  $119,2 \pm 8,8$  Stunden ergaben sich behandlungsbedingt Gipfelwerte nach  $32,6 \pm 2,1$  und  $57,6 \pm 4,5$  Stunden, wobei die jeweiligen Maximalwerte bei  $83,38 \pm 29,78$  pg/ml bzw.  $80,47 \pm 19,24$  pg/ml Plasma lagen. Die erreichten Maximalwerte der Läufigkeiten lagen in dem entsprechenden Zeitraum bei  $95,63 \pm 23,55$  pg/ml.

### 5.2.2. Überblick Versuchs- und Kontrollphasen

Aufgrund variierender Anöstruslängen zwischen den Tieren (siehe Tabelle 17, Seite 95) ergab sich für jede Hündin eine unterschiedliche Anzahl an Versuchs- und Kontrollphasen. Der chronologische Ablauf des Versuches und die Positionierung der einzelnen Versuchs- und Kontrollphasen ist in Tabelle 1 Seite 41 wiedergegeben. Die für die Versuchsauswertung getroffenen Zuordnungen zeigt Tabelle 4 (siehe Seite 57).

### 5.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen zur Freisetzung von LH

#### 5.2.3.1. Verlauf von Luteinisierendem Hormon in den Versuchs- und Kontrollphasen

Der Verlauf der LH-Konzentrationen während der Versuchsphasen  $V_A$  und  $V_D$  sowie während der Kontrollphasen  $K_A$  und  $K_D$  ist in den Abb. 7 bis Abb. 11 dargestellt.

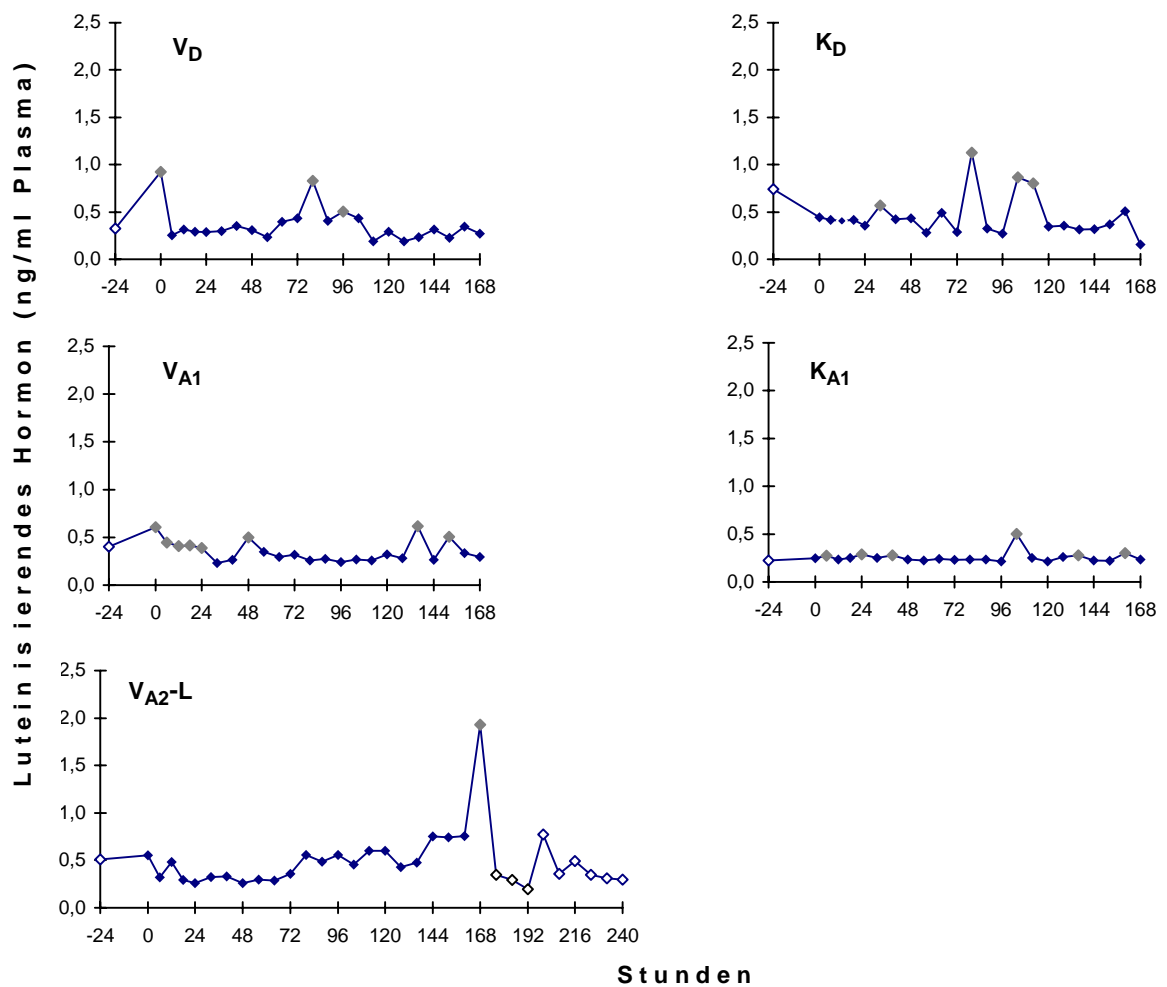


Abb. 7 Hündin Jeani: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen  $V_{A1-2}$  und  $V_D$  sowie der Kontrollphasen  $K_A$  und  $K_D$  (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)

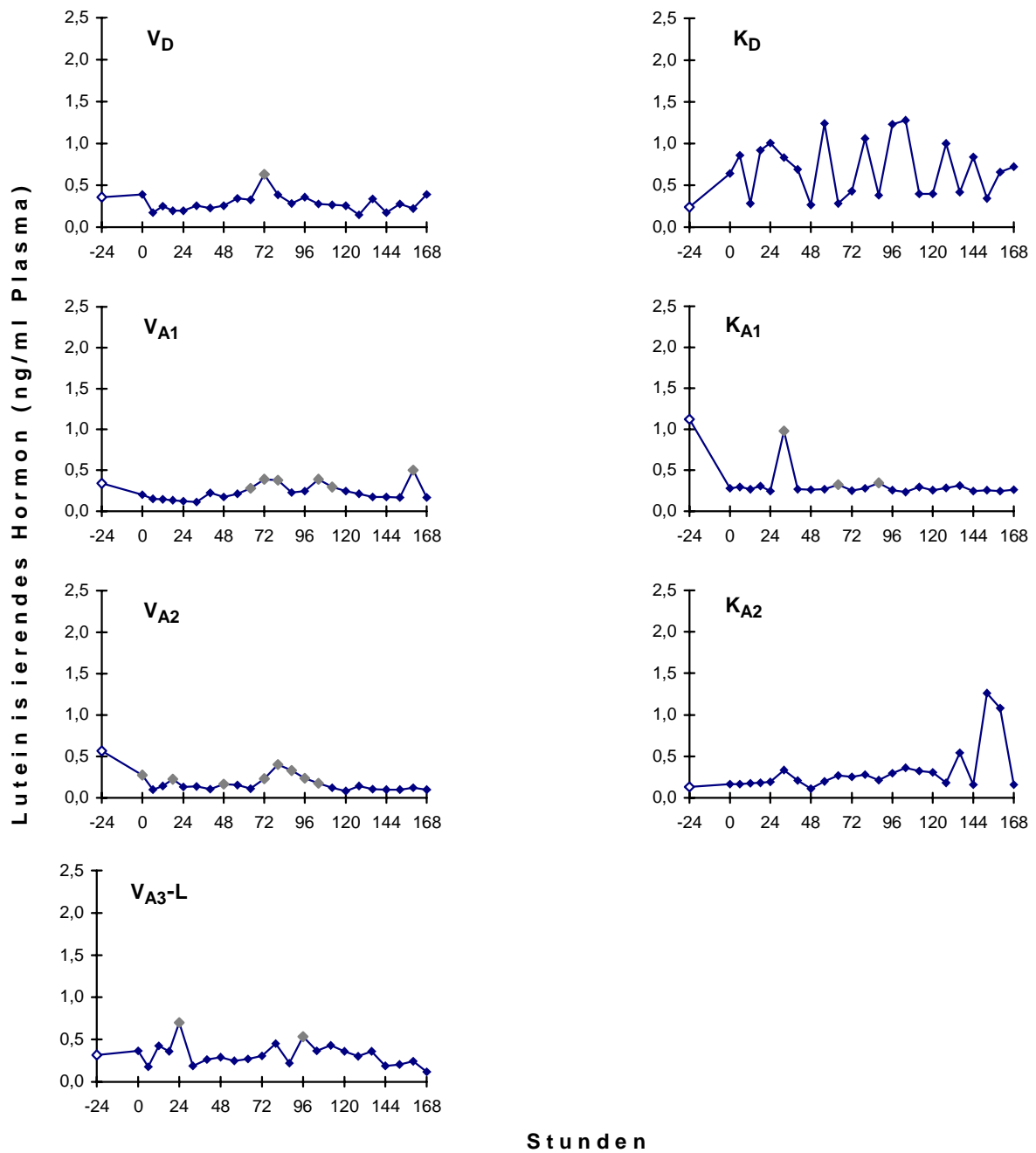


Abb. 8 Hündin Sally: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen V<sub>A1-3</sub> und V<sub>D</sub> sowie der Kontrollphasen K<sub>A1-2</sub> und K<sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)

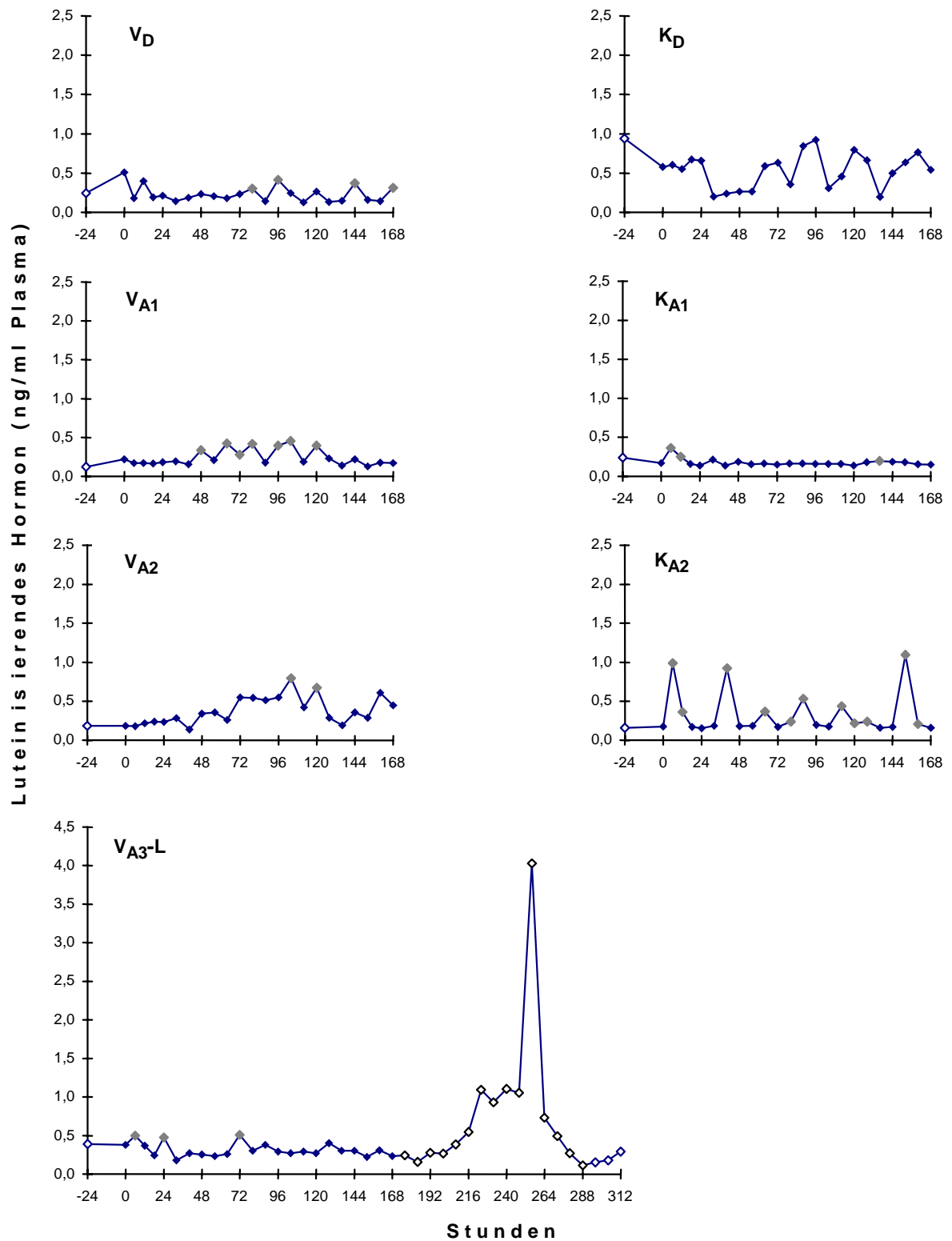


Abb. 9 Hündin Billi: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen V<sub>A1-3</sub> und V<sub>D</sub> sowie der Kontrollphasen K<sub>A1-2</sub> und K<sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)



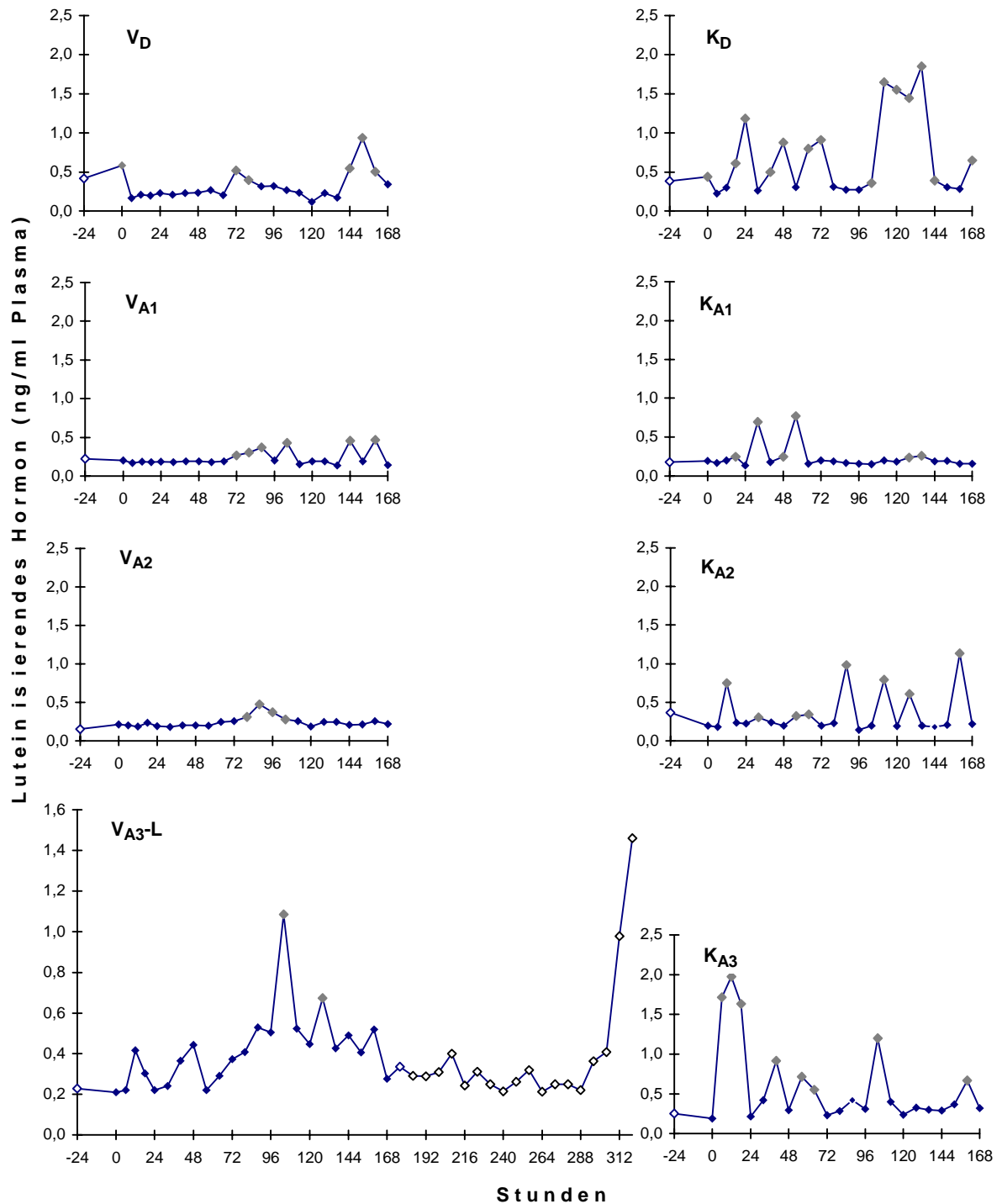


Abb. 10 Hündin Lena: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen V<sub>A1-3</sub> und V<sub>D</sub> sowie der Kontrollphasen K<sub>A1-3</sub> und K<sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)

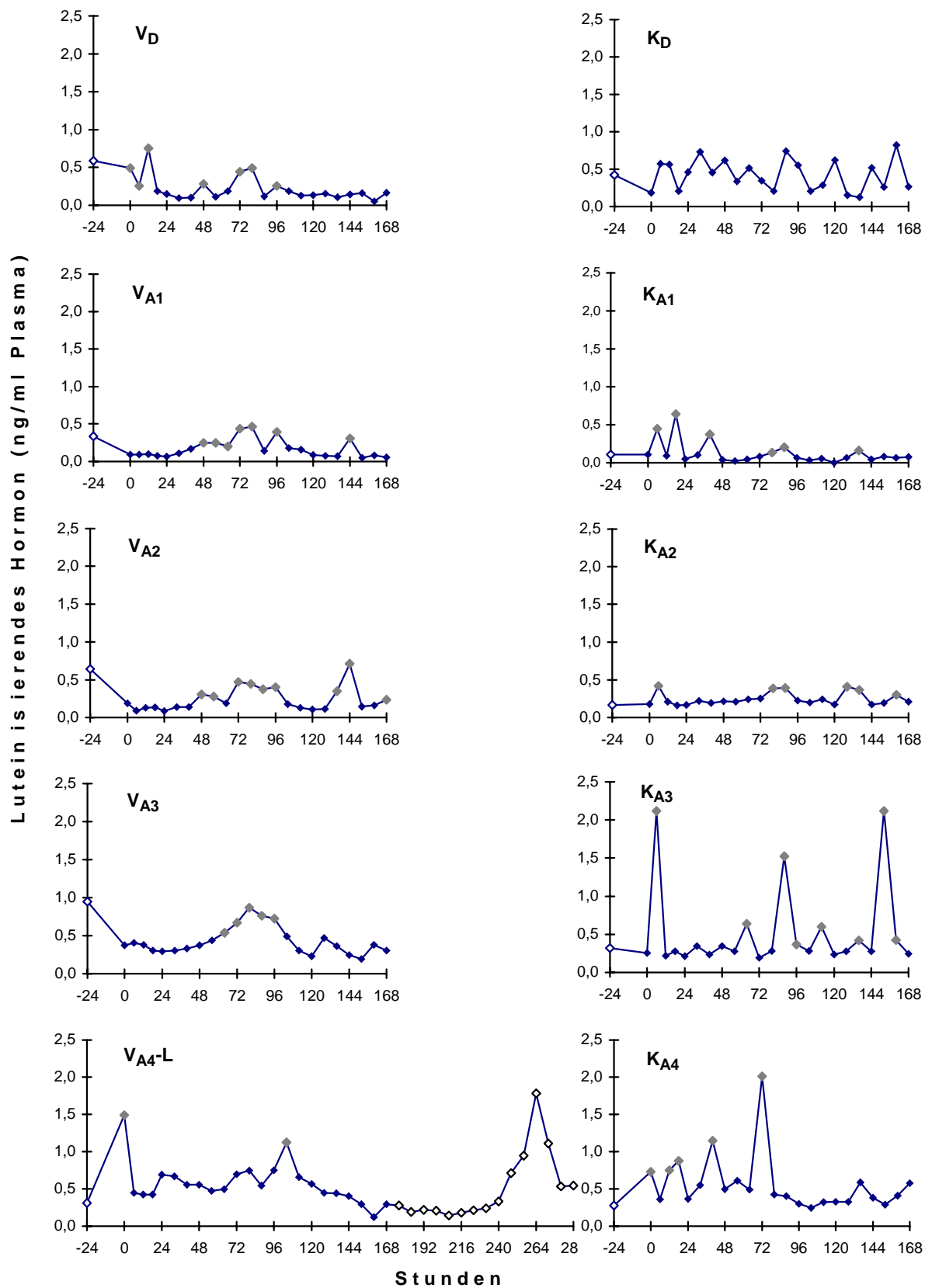


Abb. 11 Hündin Pebbels: Verlauf der LH-Konzentrationen im Plasma während der Versuchsphasen V<sub>A1-4</sub> und V<sub>D</sub> sowie der Kontrollphasen K<sub>A1-4</sub> und K<sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat bzw. Vehikel)

Die Ergebnisse der Berechnung der Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung (siehe Kapitel 4.1.1.1 und 4.1.1.2) sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 wiedergegeben und graphisch in Abb. 12 dargestellt.

Tabelle 5: Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung während der Versuchsphasen bei den 5 in den Versuch aufgenommenen Hündinnen: Maximalwerte, AUC, Basalwerte, Anzahl der Peaks, erster Peak nach Behandlungsbeginn

Parameter	Hündin	Phase				
		V <sub>A1</sub>	V <sub>A2</sub>	V <sub>A3</sub>	V <sub>A-L</sub>	V <sub>D</sub>
Maximalwerte (ng/ml)	Jeani	0,616			1,925	0,923
	Sally	0,503	0,400		0,701	0,633
	Billi	0,455	0,795		0,506	0,509
	Lena	0,467	0,474		1,085	0,936
	Pebbels	0,466	0,712	0,865	1,490	0,753
$\bar{x}_g$		0,498	0,572	0,865	1,020	0,732
SF <sup>±1</sup>		1,133	1,386		1,723	1,296
AUC (ng*ml <sup>-1</sup> * h)	Jeani	57,90			83,72	58,85
	Sally	39,87	27,43		54,12	48,09
	Billi	41,89	65,25		52,31	37,90
	Lena	39,86	41,03		72,45	53,80
	Pebbels	29,86	41,20	72,22	94,46	35,62
$\bar{x}_g$		40,945	41,703	72,22	69,504	45,981
SF <sup>±1</sup>		1,265	1,425		1,299	1,244
Basalwerte (ng/ml)	Jeani	0,284			0,461	0,303
	Sally	0,181	0,116		0,293	0,273
	Billi	0,181	0,344		0,288	0,183
	Lena	0,180	0,271		0,372	0,232
	Pebbels	0,100	0,132	0,343	0,509	0,136
$\bar{x}_g$		0,176	0,194	0,343	0,375	0,217
SF <sup>±1</sup>		1,449	1,704		1,295	1,381
Peak Anzahl	Jeani	8			1	3
	Sally	6	8		2	1
	Billi	7	2		3	6
	Lena	6	4		2	5
	Pebbels	7	9	5	2	7
$\bar{x}_g$		6,8	4,9	5,0	1,9	3,6
SF <sup>±1</sup>		1,1	2,0		1,5	2,2
1. Peak (Zeitpunkt in h)	Jeani	48			88	80
	Sally	64	48		96	72
	Billi	48	104		72	80
	Lena	72	80		104	72
	Pebbels	48	48	64	104	48
$\bar{x}_g$		55,138	66,169	64	91,967	69,250
SF <sup>±1</sup>		1,215	1,471		1,166	1,236

Tabelle 6: Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung während der Kontrollphasen bei den 5 in den Versuch aufgenommenen Hündinnen: Maximalwerte, AUC, Basalwerte, Anzahl der Peaks, erster Peak nach Behandlungsbeginn

Parameter	Hündin	Phase				
		K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K <sub>A3</sub>	K <sub>A4</sub>	K <sub>D</sub>
Maximalwerte (ng/ml)	Jeani	0,502				1,127
	Sally	0,978	1,260			1,279
	Billi	0,361	1,094			0,924
	Lena	0,769	1,133	1,976		1,852
	Pebbels	0,641	0,419	2,119	2,012	0,825
$\bar{x}_g$		0,614	0,899	2,046	2,012	1,153
SF <sup>±1</sup>		1,469	1,670	1,051		1,370
AUC (ng*ml <sup>-1</sup> * h)	Jeani	43,42				76,56
	Sally	51,55	56,63			118,3
	Billi	29,66	57,03			88,61
	Lena	40,43	61,61	98,73		117,7
	Pebbels	20,46	42,37	89,52	93,32	72,90
$\bar{x}_g$		35,309	53,884	94,010	93,32	92,813
SF <sup>±1</sup>		1,440	1,179	1,072		1,260
Basalwerte (ng/ml)	Jeani	0,235				0,364
	Sally	0,268	0,230			0,714
	Billi	0,162	0,175			0,532
	Lena	0,175	0,201	0,307		0,281
	Pebbels	0,062	0,204	0,263	0,410	0,424
$\bar{x}_g$		0,162	0,202	0,284	0,410	0,440
SF <sup>±1</sup>		1,776	1,118	1,116		1,429
Peak Anzahl	Jeani	6				4
	Sally	3	3			0
	Billi	2	10			0
	Lena	6	8	10		14
	Pebbels	6	6	8	5	0
$\bar{x}_g$		4,193	6,160	8,944	5	1,476
SF <sup>±1</sup>		1,667	1,688	1,171		4,696
1. Peak (Zeitpunkt in h)	Jeani	6				80
	Sally	32	6			
	Billi	6	6			
	Lena	18	12	6		18
	Pebbels	6	6	6	12	
$\bar{x}_g$		10,447	7,135	6,000	12	37,947
SF <sup>±1</sup>		2,195	1,414	1,000		2,871

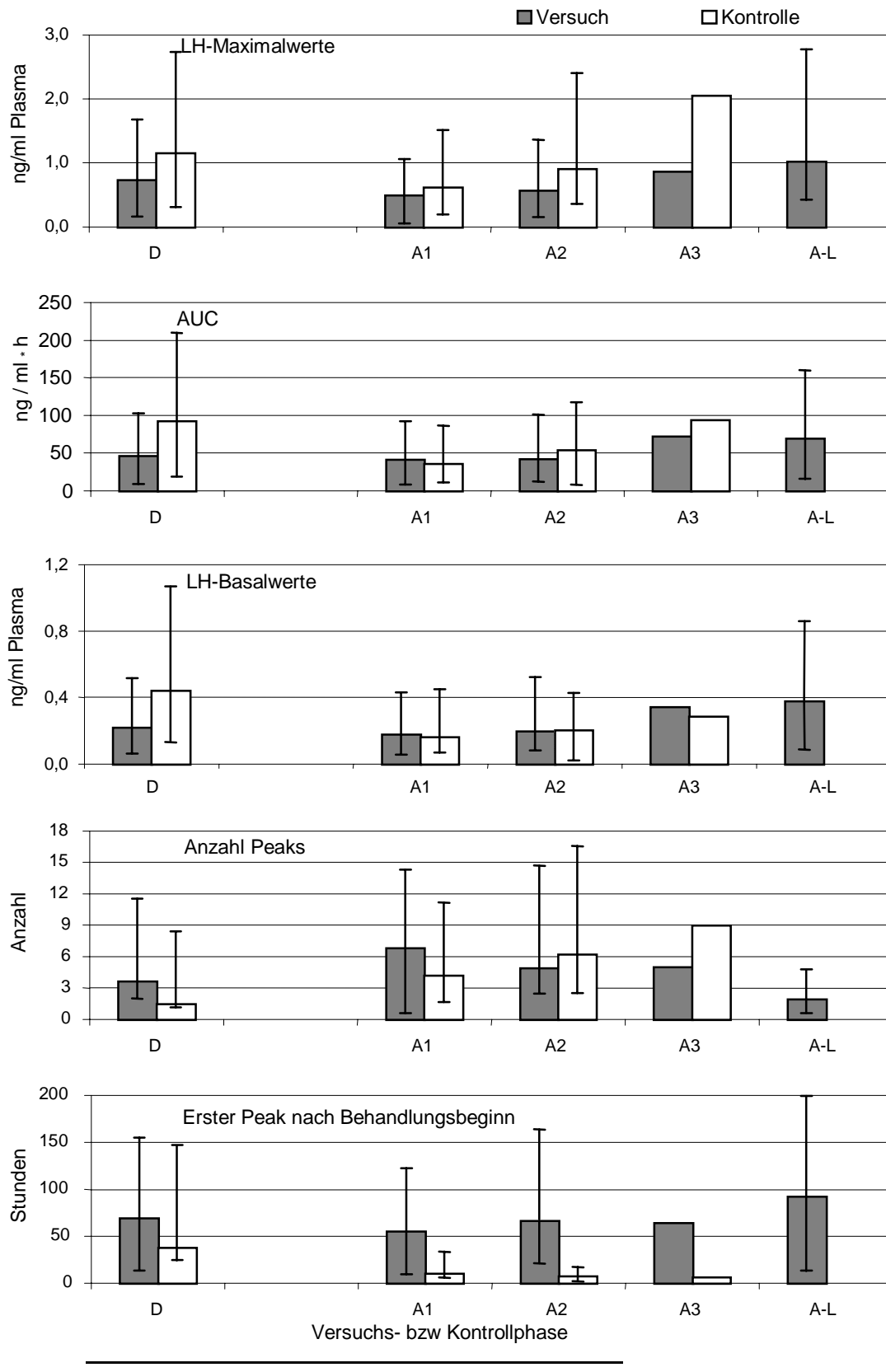


Abb. 12: Graphische Darstellung der Maximalwerte, AUC, Basalwerte, Peak Anzahl und erster Peak nach Behandlungsbeginn ( $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$ ) der Versuchs und Kontrollphasen; — Daten in zweifache Varianzanalyse einbezogen; - - - Daten in Trendanalyse einbezogen;

Bei der Anwendung der in Kap. 4.1.1.2 beschriebenen statistischen Verfahren ergaben sich folgende Ergebnisse:

Maximalwerte: In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Behandlungs- und Zeiteffekt, das heißt es wurden höhere Maximalwerte in den Kontrollphasen als in den Versuchsphasen und im Mittel höhere Maximalkonzentrationen im Diöstrus als im Anöstrus A1 und A2 gemessen.

Die Trendanalyse zeigte ein signifikantes ( $p < 0,05$ ) Ansteigen der Maximalwerte im Verlauf des Anöstrus der Versuchs- und Kontrollphase.

AUC: In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter Behandlungseffekt, der - wie aus Abb. 12 ersichtlich - nur in den Phasen A2 und D erkennbar war. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Versuchs- und Kontrollphasen (D, A1 und A2) ist weiterhin ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Zeiteffekt festzustellen. Zwischen dem Faktor Behandlung und Zyklusphase ergaben sich hochsignifikante Wechselwirkungen, das heißt - wie auch aus Abb. 12 ersichtlich ist - war der Behandlungseffekt im Diöstrus stärker als im Anöstrus (A1, A2). Demnach ergibt sich der errechnete Zeiteffekt vor allem aus den Werten der Kontrollphase.

Die Trendanalyse zeigte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) steigende Sekretion (gemessen an der AUC) im Verlauf des Anöstrus der Versuchs- und Kontrollphase.

Basalwerte: In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Zeiteffekt. Ein Behandlungseffekt konnte statistisch nicht abgesichert werden, obwohl der Unterschied der Basalkonzentrationen im Diöstrus zwischen Versuchs- und Kontrollphase mit  $p < 0,02$  signifikant ist. Auch bei der Analyse der Basalwerte zeigte sich eine schwach signifikante Wechselwirkungen zwischen Behandlungen und Zyklusphase, das heißt - wie aus Abb. 12 ersichtlich ist - daß der Behandlungseffekt im Diöstrus stärker war als im Anöstrus (A1, A2). Demnach ergibt sich auch bei den Basalwerten der Zeiteffekt vor allem aus den hohen Werten der Kontrollphase.

Die Trendanalyse zeigte ein signifikantes Ansteigen der basalen LH-Sekretion im Verlauf des Anöstrus der Versuchsphase.

Peak Anzahl: In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Zeiteffekt, das heißt, die mittlere Anzahl der Peaks sinkt im Diöstrus im Vergleich zum Anöstrus. Es ließ sich kein Behandlungseffekt nachweisen. In der Versuchsphase zeigt die Trendanalyse eine signifikante Abnahme der Anzahl der

Peaks im Verlauf des Anöstrus.

erster Peak nach Behandlungsbeginn: In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Behandlungs- und Zeiteffekt. Weiterhin ergaben sich signifikante Wechselwirkungen zwischen den Behandlungen und den Zyklusphasen. Das bedeutet, daß in den Versuchsphasen der erste LH-Peak nach der Behandlung später auftrat als in den Kontrollphasen, sowie daß im Diöstrus die ersten Peaks im Mittel später auftraten als im Anöstrus.

Die Trendanalyse zeigt, daß in der Versuchsphase gegen Ende des Anöstrus die ersten Peaks nach Behandlungsbeginn signifikant später auftreten als zu Beginn.



### 5.2.3.2. Verlauf von Luteinisierendem Hormon vor und nach der Behandlung bei kastrierten Hündinnen

Die Verlaufskurven von Luteinisierendem Hormon der fünf Versuchstiere sind in Abb. 13 dargestellt, eine mittlere Verlaufskurve zeigt Abb. 14.

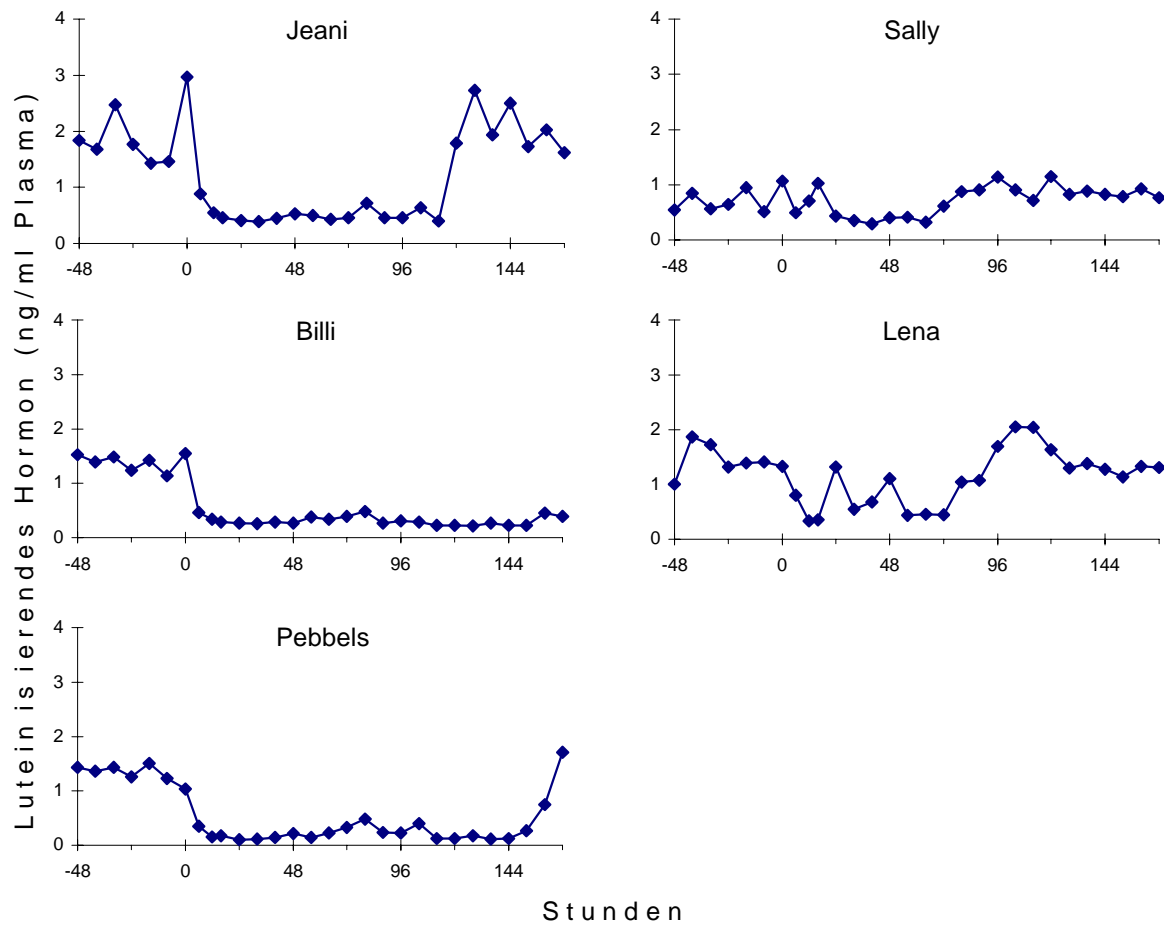


Abb. 13: Verlauf des Luteinisierenden Hormons nach der Kastration vor und nach Behandlung mit Estradiolbenzoat  
(0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)

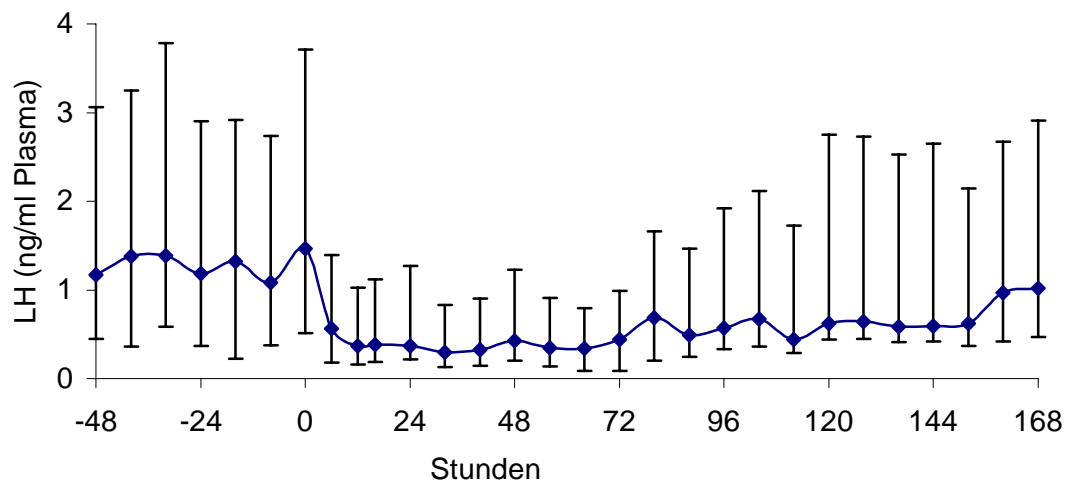


Abb. 14: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x}_g \pm SF^{\pm 1}$ ) von Luteinisierendem Hormon nach Kastration vor und nach der Behandlung mit Estradiolbenzoat (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse der Einzelwerte über den Faktor Zeit zeigt sich ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Einfluß durch die Behandlung auf die LH-Sekretion.

In Tabelle 7 sind die Werte für die Parameter Maximalwert, AUC und Basalwert (siehe Kap. 4.1.1.4) nach Unterteilung des erfaßten Zeitraumes in vier 48-Stundenabschnitten, in Tabelle 8 die p-Werte der statistischen Auswertung mittels gepaartem t-Test angegeben. Abb. 15 gibt die Ergebnisse aus Tabelle 7 in graphischer Form wieder.

Tabelle 7: Charakterisierung der LH Freisetzung während der Versuchsphase nach der Kastration und Behandlung mit Estradiolbenzoat: Maximalwert, AUC und Basalwert

48- Stunden Intervall	Parameter	Hündin					$\bar{x}_g^*(SF^{\pm 1})$
		Jeani	Sally	Billi	Lena	Peb- bels	
a -48-0	Maximalwerte (ng/ml)	2,963	1,068	1,548	1,863	1,505	1,689*(1,452)
	AUC (ng*ml <sup>-1</sup> * h)	89,664	34,640	65,708	71,004	64,092	62,170*(1,423)
	Basalwert (ng/ml)	1,944	0,734	1,393	1,435	1,320	1,304*(1,426)
b 0-48	Maximalwerte (ng/ml)	0,880	1,029	0,465	1,320	0,348	0,720*(1,751)
	AUC (ng*ml <sup>-1</sup> * h)	38,693	38,105	22,862	49,862	13,022	29,379*(1,709)
	Basalwert (ng/ml)	0,521	0,551	0,316	0,674	0,173	0,403*(1,730)
c 48-96	Maximalwerte (ng/ml)	0,715	1,136	0,476	1,700	0,482	0,795*(1,741)
	AUC (ng*ml <sup>-1</sup> * h)	24,396	31,272	17,084	38,896	13,100	23,145*(1,555)
	Basalwert (ng/ml)	0,460	0,712	0,359	0,860	0,274	0,488*(1,605)
d 96-144	Maximalwerte (ng/ml)	2,733	1,148	0,283	2,050	0,399	0,938*(2,705)
	AUC (ng * ml <sup>-1</sup> * h)	71,772	43,656	11,828	79,148	8,864	30,409*(2,784)
	Basalwert (ng/ml)	1,666	0,884	0,240	1,614	0,176	0,631*(2,889)

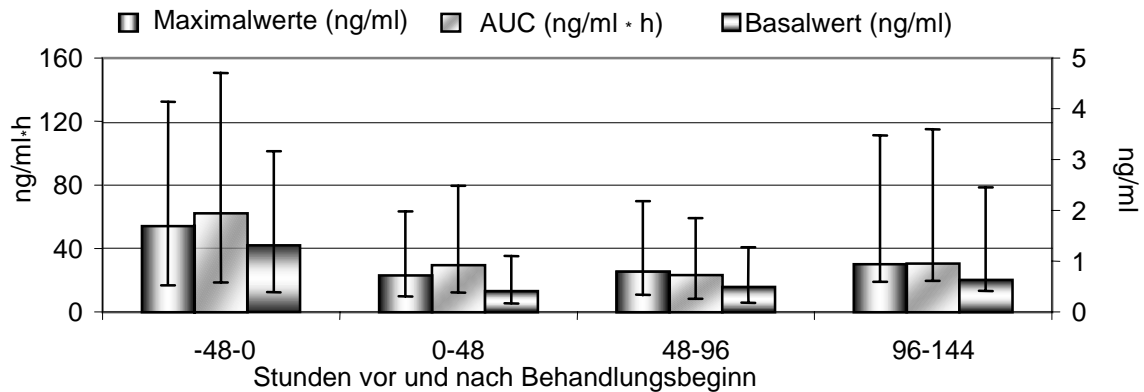


Abb. 15: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x}_g * Sf^{\pm 1}$ ) der Parameter AUC, Maximalwert und Basalwert zur Charakterisierung der LH-Freisetzung nach Kastration und Behandlung mit Estradiolbenzoat

Tabelle 8: Versuchsphase Kastration: Maximalwert, AUC, Basalwert; Gruppenvergleich mittels gepaartem t-Test; Angabe von p-Werten

t-Test	a/b	a/c	a/d	b/c	b/d	c/d
Maximalwert	0,019*	0,035*	0,100	0,175	0,187	0,314
AUC	0,031*	0,012*	0,101	0,017*	0,447	0,201
Basalwert	0,009*	0,016*	0,103	0,057	0,082	0,237

\* Unterschied gesichert

Tabelle 8 zeigt, daß sich in den 48 Stunden nach Behandlungsbeginn signifikant niedrigere Werte für alle Parameter ergaben, verglichen mit den Werten vor der Behandlung. Dieser Status blieb bis 96 Stunden nach Behandlungsbeginn bestehen, wobei die AUC im Vergleich zu den ersten 48 Stunden nach Behandlungsbeginn nochmals signifikant ( $p < 0,05$ ) abfiel. Aufgrund der großen Streuung der Werte sind für den Zeitraum 96 bis 144 Stunden im Vergleich zu den übrigen Intervallen keine Unterschiede mehr zu errechnen.

#### 5.2.4. Ergebnisse der Untersuchungen zum Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen in den Kontrollphasen

Der Verlauf von Estradiol-17 $\beta$  während der Kontrollphasen ist in den Abb. 16 bis Abb. 20 dargestellt

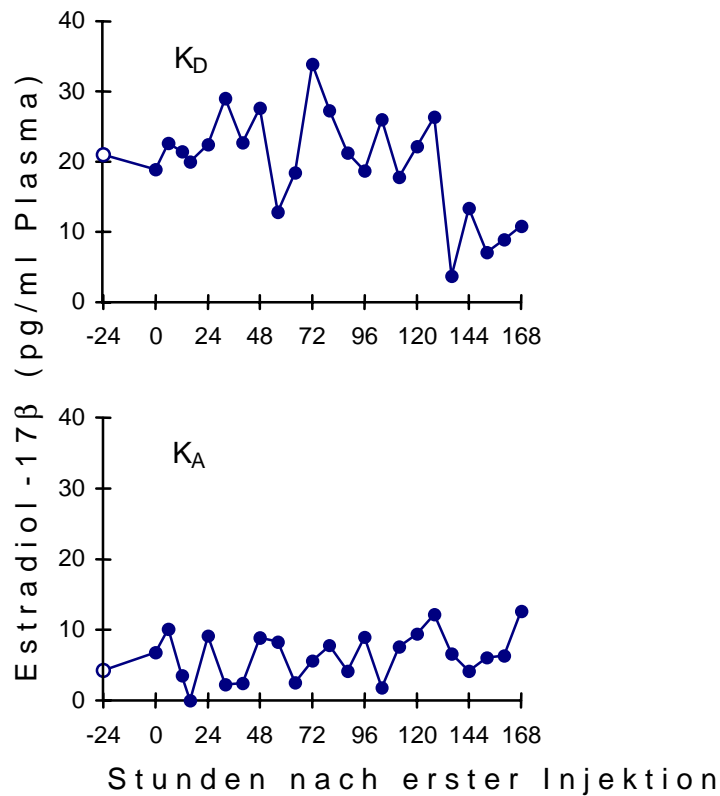


Abb. 16 Hündin Jeani: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen  $K_A$  und  $K_D$   
(0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)

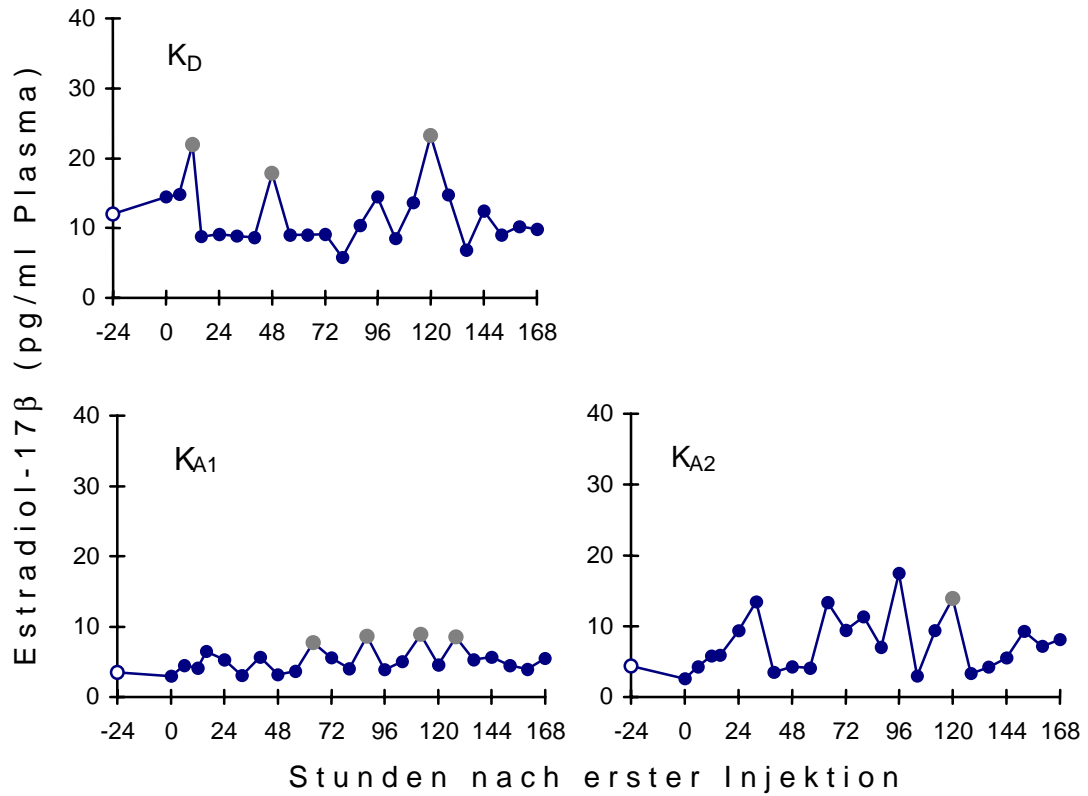


Abb. 17 Hündin Sally: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K<sub>A1-2</sub> und K<sub>D</sub>  
(0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)

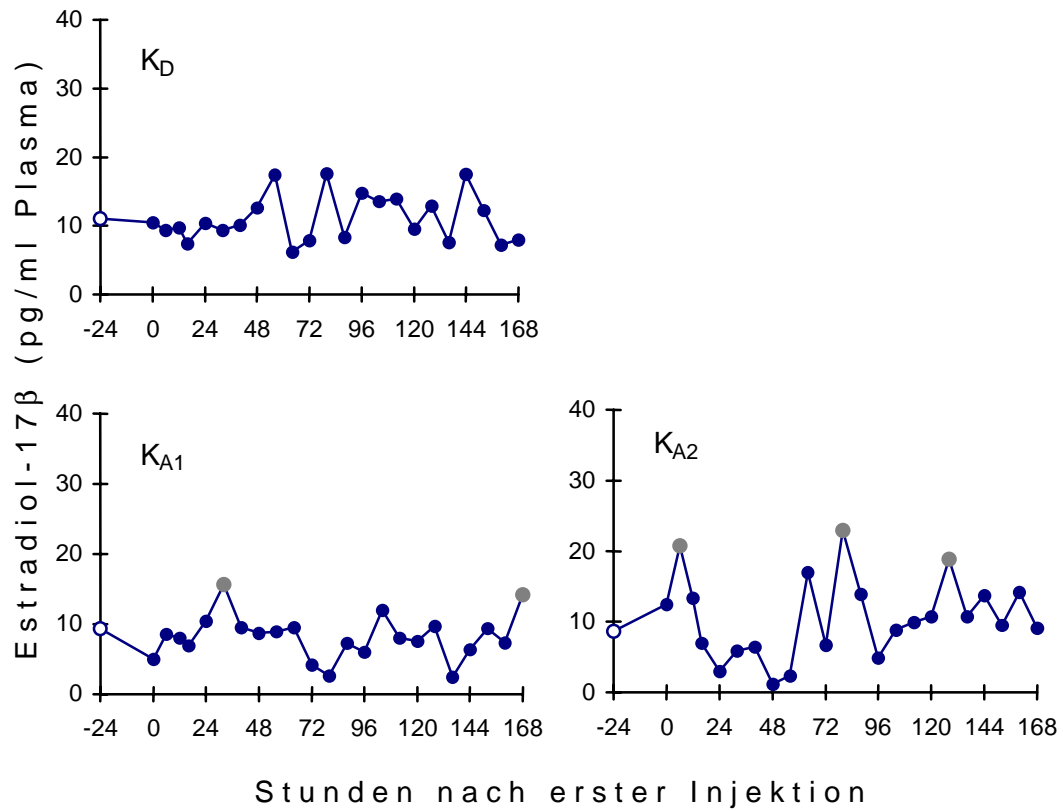


Abb. 18 Hündin Billi: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K<sub>A1-2</sub> und K<sub>D</sub>  
(0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)

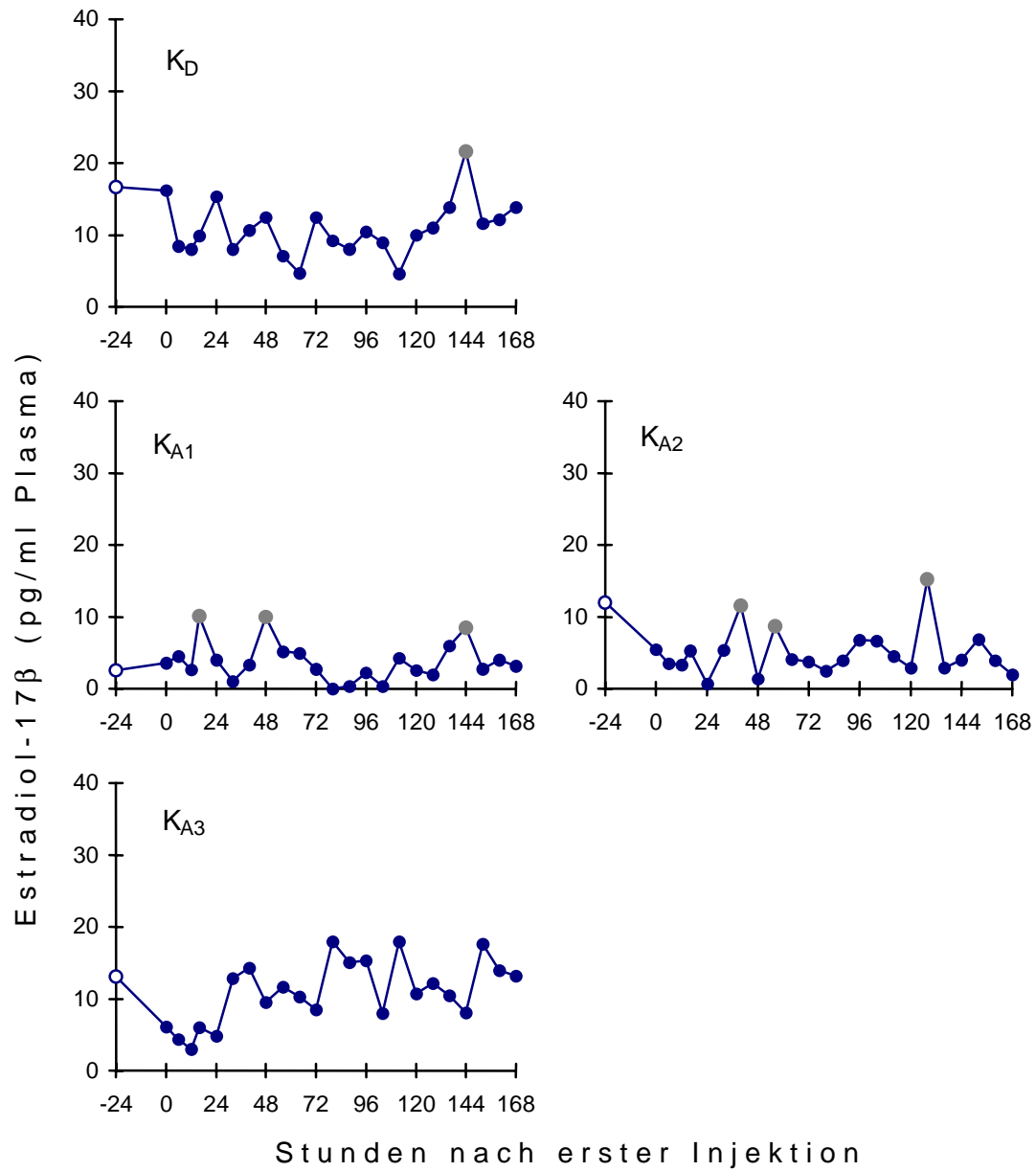


Abb. 19 Hündin Lena: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K<sub>A1-3</sub> und K<sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)



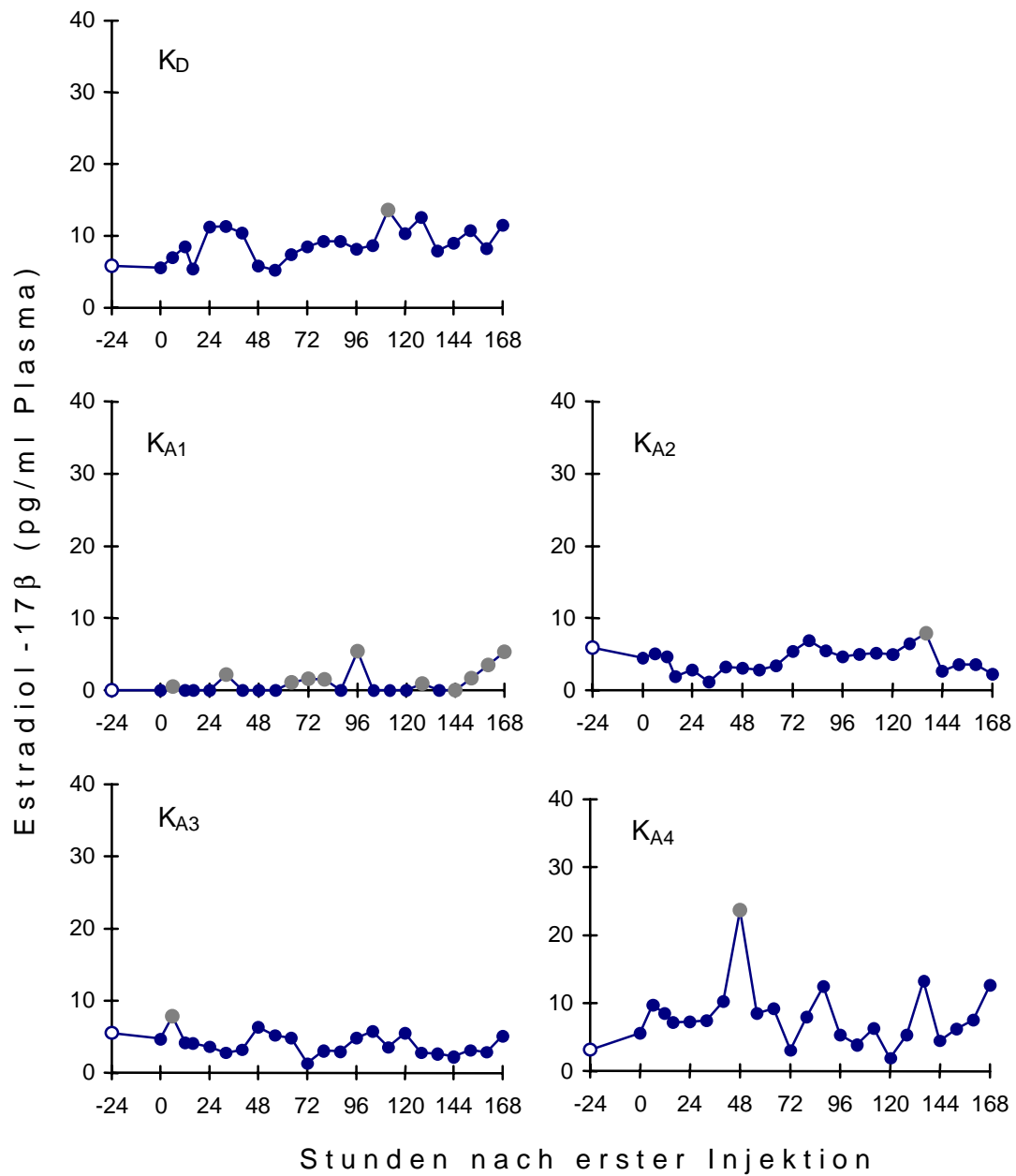


Abb. 20 Hündin Pebbels: Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma während der Kontrollphasen K<sub>A1-4</sub> und K<sub>D</sub> (0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit dem Vehikel)

Die für die in Kapitel 4.1.2.3 angegebenen Parametern erhaltenen Werte sind in Tabelle 9 zusammengefaßt und graphisch in Abb. 21 wiedergegeben.

Tabelle 9: Parameter zur Charakterisierung der Estradiol-17 $\beta$  Freisetzung während der Kontrollphasen: Maximalwert, AUC, Basalwert und Anzahl der Peaks

Parameter	Hündin	Phase				
		K <sub>D</sub>	K <sub>A1</sub>	K <sub>A2</sub>	K <sub>A3</sub>	K <sub>A4</sub>
Maximalwerte (pg/ml)	Jeani	33,88	12,6			
	Sally	23,2	8,92	17,48		
	Billi	17,64	15,68	22,96		
	Lena	21,6	10,12	15,24	17,92	
	Pebbels	13,56	5,36	7,88	7,88	23,64
$\bar{x}_g$		20,976	9,91	14,81	11,88	23,64
SF $^{\pm 1}$		1,40	1,50	1,57	1,78	
AUC (pg*ml <sup>-1</sup> *h)	Jeani	3340,6	1053,9			
	Sally	1953,6	893,3	1318,4		
	Billi	1886,8	1369,3	1763,7		
	Lena	1781,1	633,7	862,4	1648,2	
	Pebbels	1517,3	166,2	712,7	665,2	1369
$\bar{x}_g$		2015,7	670,7	1093,4	1047	1369
SF $^{\pm 1}$		1,3	2,2	1,5	1,8	
Basalwerte (pg/ml)	Jeani	19,72	6,38			
	Sally	10,38	4,58	7,19		
	Billi	11,06	7,56	9,05		
	Lena	10,3	3,00	3,99	10,96	
	Pebbels	8,73	0,00	4,02	3,88	7,48
$\bar{x}_g$		11,53	3,67	5,68	6,52	7,48
SF $^{\pm 1}$		1,37	2,24	1,51	2,08	
Peak Anzahl /168 h	Jeani	0	0			
	Sally	3	4	1		
	Billi	0	2	3		
	Lena	1	3	3	0	
	Pebbels	1	11	1	1	1
$\bar{x}_g$		0,94	2,66	1,73	0,71	1,00
SF $^{\pm 1}$		2,08	3,08	1,89	1,63	

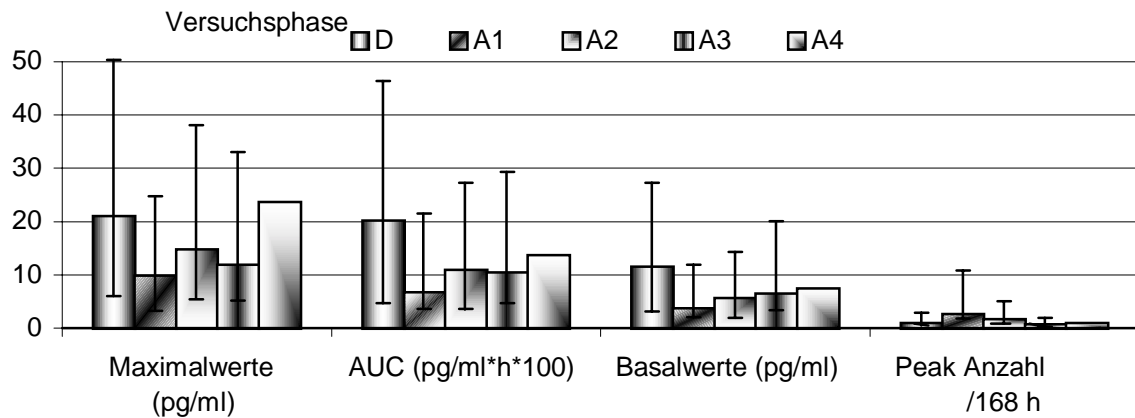


Abb. 21: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x}_g \pm Sf^{\pm 1}$ ) der Parameter Maximalwert, Basalwert, Peak Anzahl und AUC der Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung während der Kontrollphasen

Nach Anwendung der in Kap.4.1.2.3 beschriebenen statistischen Verfahren ergaben sich für die erhobenen Parameter folgende Ergebnisse:

**Maximalwerte:** In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter Zeiteffekt, das heißt - wie aus Abb. 21 ersichtlich – es werden im Mittel höhere Maximalkonzentrationen im Diöstrus als im Anöstrus (A1 und A2) gemessen.

Die Trendanalyse zeigt ein signifikantes Ansteigen der Maximalwerte im Verlauf des Anöstrus.

**AUC:** In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter Zeiteffekt, das heißt - wie aus Abb. 21 ersichtlich – es ist eine im Mittel niedrigere Sekretion über beide Phasen des Anöstrus (A1 und A2) im Vergleich zum Diöstrus festzustellen.

Die Trendanalyse zeigt eine signifikant steigende Sekretion im Verlauf des Anöstrus.

**Basalwerte:** In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein signifikanter Zeiteffekt, das heißt, die basale LH-Sekretion - ist wie aus Abb. 21 ersichtlich – im Anöstrus (A1 und A2) niedriger als im Diöstrus.

Die Trendanalyse für den Anöstrus verlief negativ.

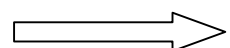
**Peak Anzahl:** Hier konnten keine signifikanten Effekte errechnet werden.

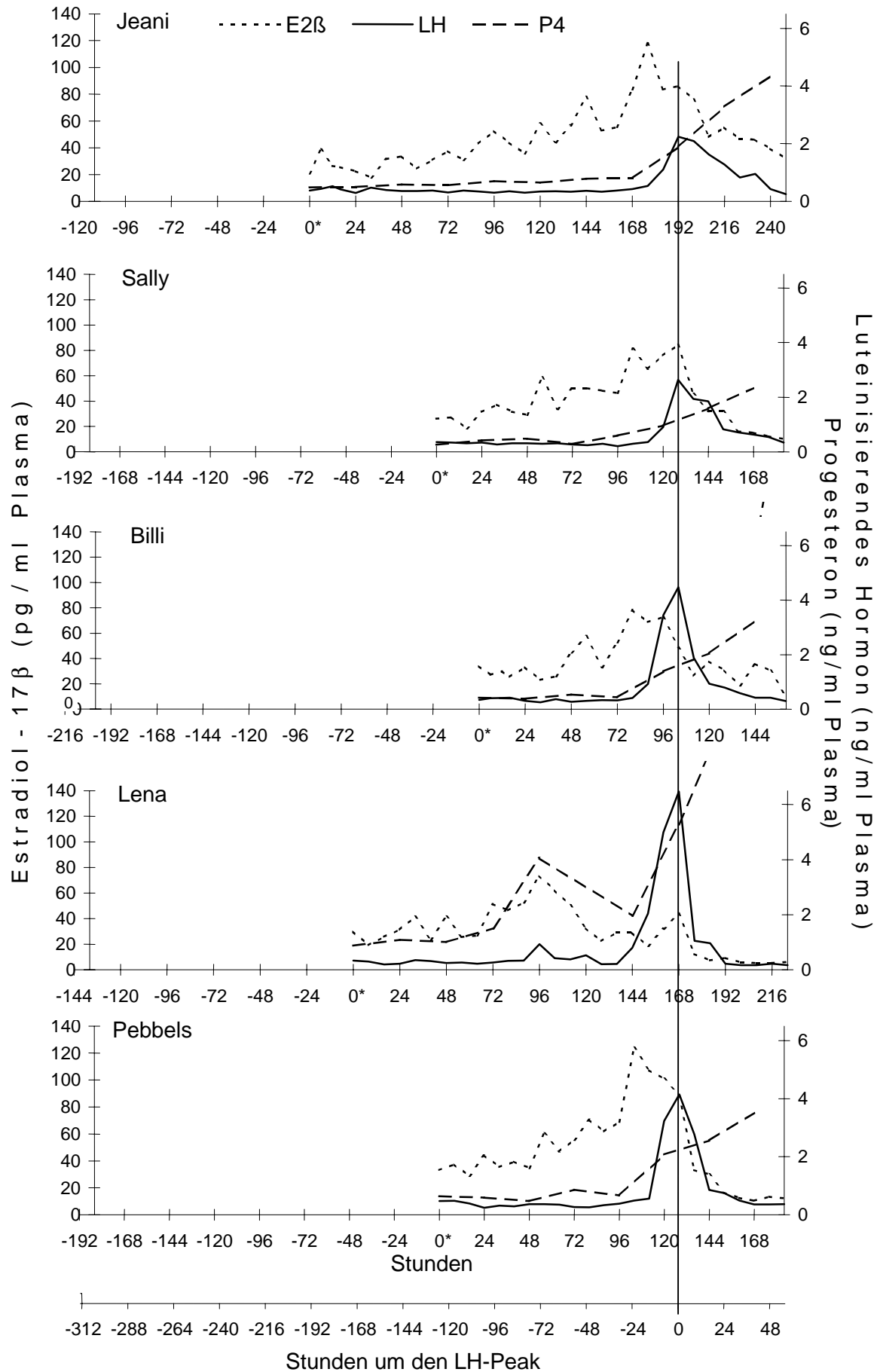
#### **5.2.5. Vergleich der Läufigkeiten der Kontrollphasen mit denen während bzw. unmittelbar im Anschluß an eine Versuchsphase**

Während der Kontrollphasen wurden 5 regulär auftretende Läufigkeiten erfaßt und ausgewertet. Bei den nach einer Versuchsphase aufgetretenen Läufigkeiten konnten nur die Ergebnisse von vier Hündinnen erfaßt und ausgewertet werden, da bei der als erste läufig gewordenen Hündin Sally die Blutentnahmen nach Ablauf der regulären 168 Stunden beendet wurden.

In den Abb. 22 bis Abb. 23 sind die Verläufe der Konzentrationen der Hormone Progesteron, Estradiol-17 $\beta$  und Luteinisierendes Hormon für die Läufigkeiten der Kontrollphasen (K-L) und nach einer Versuchsphase (V<sub>A</sub>-L) dargestellt.

Abb. 22: Verlauf der Hormone Estradiol-17 $\beta$ , Luteinisierendes Hormon und Progesteron bei den regulär auftretenden Läufigkeiten (K-L) (0\* = Zeitpunkt des Auftretens der proöstrischen Blutung)





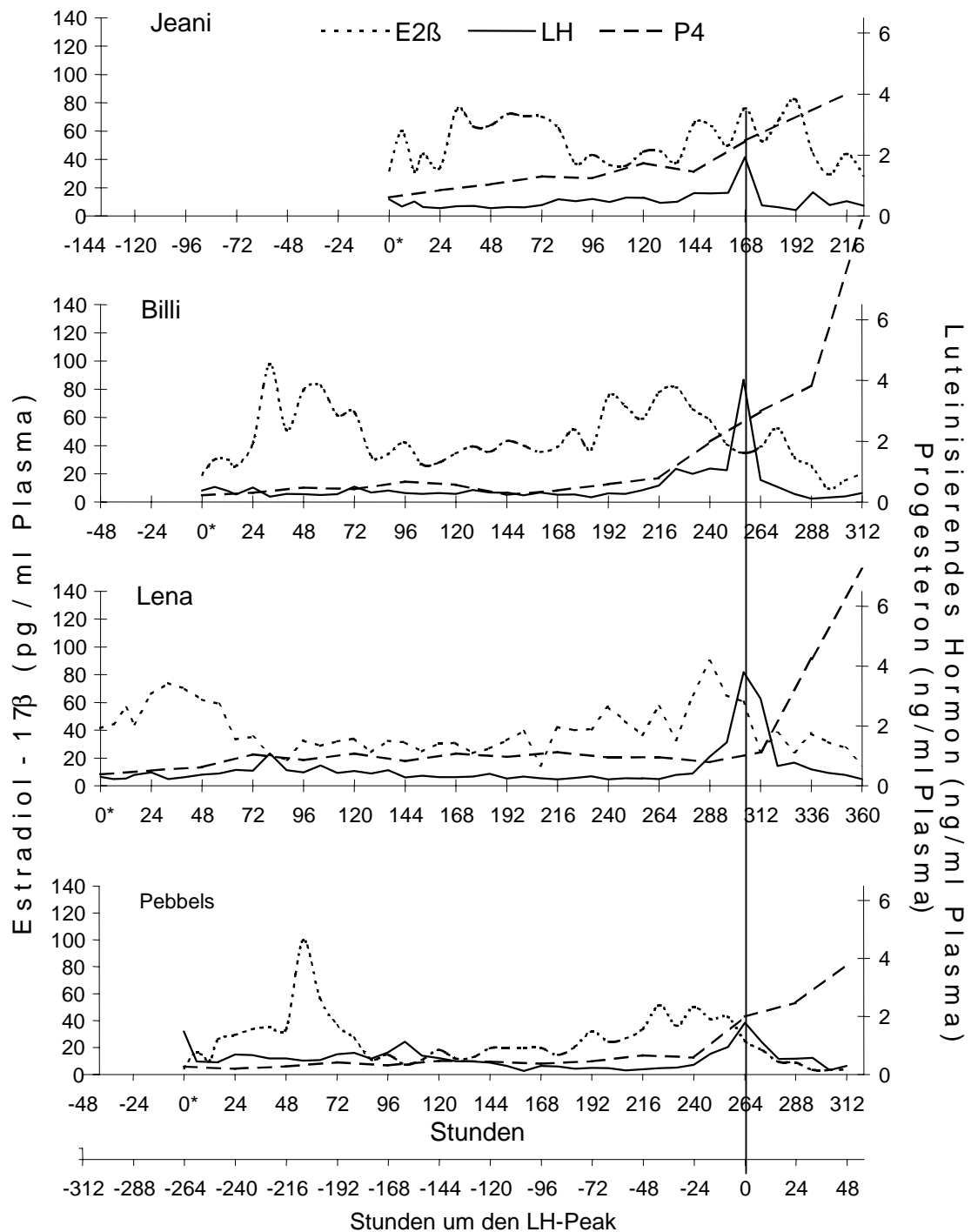


Abb. 23: Verlauf der Hormone Estradiol-17 $\beta$ , Luteinisierendes Hormon und Progesteron der letzten Versuchsphase im Anöstrus mit sich anschließender Läufigkeit V<sub>A</sub>-L (0\* = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)

Tabelle 10 zeigt die Zeitspanne vom Beginn des Proöstrus bis zur Duldung bzw. bis zum Ansteigen der Progesteronsekretion (Progesteron >1ng/ml Plasma, siehe Kap. 4.1.3).

Tabelle 10: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Zeitspanne Beginn Proöstrus bis zur Duldung bzw. bis zum Ansteigen der Progesteronwerte auf >1ng/ml Plasma

Zeitspanne	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
		Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
Beginn des Proöstrus bis Duldung (h)	K-L	128	144	144	144	120	136±(11,31)
	V <sub>A</sub> -L	80	144	168	112	128	126±(33,19) <sup>a)</sup>
Beginn des Proöstrus bis P4-Anstieg (h)	K-L	152	144	96	168	112	134±(29,61)
	V <sub>A</sub> -L	104	144	168	136	144	139±(23,05) <sup>b)</sup>

a) b) Unterschiede mit p<0,05 gesichert

In der Läufigkeit der Versuchsphase ist die Zeitspanne bis zum Anstieg der Progesteronsekretion signifikant (p<0,05) länger als die bis zum Beginn der Duldung. Weiteren Unterschiede ergaben sich nicht.

In Tabelle 11 sind die für die LH-Sekretion errechneten Werte dargestellt.

Tabelle 11: Vergleich Läufigkeiten der Versuchs- und Kontrollphase: Charakterisierung der LH-Sekretion vor und während der LH-Peaks

Zeit-spanne	Parameter	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
			Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
Beginn PÖ -	Dauer in h	K-L	128	80	72	112	96	97,60±(20,50)
		V <sub>A</sub> -L	80		128	120	112	110,00±(18,20)
Beginn LH-Gipfel	AUC (pg*ml <sup>-1</sup> *h)	K-L	44,58	22,49	24,32	37,75	32,49	32,33±( 8,25)
		V <sub>A</sub> -L	37,60		37,07	33,45	30,57	34,67±( 2,86)
	Dauer in h	K-L	88	80	80	48	80	75,0 ±(13,90)
		V <sub>A</sub> -L	80		80	88	72	80,0 ±( 5,70)
LH-Gipfel	AUC (pg*ml <sup>-1</sup> *h)	K-L	91,65	83,08	111,20	123,42	109,28	103,72±(14,46) <sup>a)</sup>
		V <sub>A</sub> -L	48,06		82,42	98,71	50,90	70,02±(21,36) <sup>b)</sup>
	Maximal werte(ng/ml)	K-L	2,24	2,64	4,46	6,47	4,149	3,99±( 1,50) <sup>c)</sup>
		V <sub>A</sub> -L	1,93		4,03	3,80	1,78	2,88±( 1,03) <sup>d)</sup>

a) b) c) d) Unterschied mit p<0,01 (a/b) bzw. 0,05 (c/d) gesichert

Die Berechnungen ergaben einen signifikant (p<0,01) niedrigeren Wert für die AUC des LH-Peaks der Versuchs- im Vergleich zur Kontrollphase, auch die Maximalwerte

lagen schwach signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger.

In Tabelle 12 wird die Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion während des Proöstrus charakterisiert.

Tabelle 12: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Charakterisierung der Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung während des Proöstrus

Zeit- spanne	Para- meter	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
			Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
Proöstrus bis zur Duldung	AUC	K-L	5324,7	5844,9	5947,2	5241,4	6227,2	5717,1 $\pm$ ( 421,2)
		V <sub>A</sub> -L	4002,9		7551,1	4244,8	3714,0	4878,2 $\pm$ (1795,1)
	Dauer	K-L	128	144	144	144	120	136,0 $\pm$ ( 11,3)
		V <sub>A</sub> -L	80	144	168	112	128	126,4 $\pm$ ( 33,1)
Proöstrus bis P4- Anstieg	AUC	K-L	7493,4	5844,9	3865,6	5865,6	6227,2	5859,3 $\pm$ (1302,0)
		V <sub>A</sub> -L	5387,0		7551,1	4996,8	3714,0	5412,2 $\pm$ (1595,0)
	Dauer	K-L	152	144	96	168	112	134,4 $\pm$ ( 29,6)
		V <sub>A</sub> -L	104	144	168	136	144	139,2 $\pm$ ( 23,0)

Für die erfaßten Parameter waren keine signifikanten Unterschiede zu errechnen.

In Tabelle 13 werden die Parameter zur Charakterisierung der LH-Freisetzung für den Zeitraum -112 bis +52 Stunden um das LH-Maximum der Läufigkeiten in der Kontroll- und in der Versuchsphase wiedergegeben.

Tabelle 13: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Charakterisierung der LH-Freisetzung für den Zeitraum -112 bis +52 um das LH-Maximum

Parameter	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm SD$
		Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
AUC	K-L	121,47	110,72	144,47	168,56	140,21	137,09 $\pm$ (22,33) <sup>a)</sup>
	V <sub>A</sub> -L	93,892		104,6	121,76	74,456	98,68 $\pm$ (19,81) <sup>b)</sup>
Basalwerte	K-L	0,35	0,296	0,36	0,239	0,349	0,32 $\pm$ ( 0,05)
	V <sub>A</sub> -L	0,482		0,268	0,287	0,224	0,32 $\pm$ ( 0,11)

a) b) Unterschied mit  $p < 0,05$  signifikant

Beim Vergleich der Läufigkeiten der Kontrollphase mit denen der Versuchsphase ergeben sich für die Versuchsphase signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Werte für die AUC.

Das Auftreten der Ovulation nach dem gemessenen LH-Maximum des präovulatorischen LH-Peaks ist in Tabelle 14 dargestellt.



Tabelle 14: Vergleich Läufigkeit Versuchs- und Kontrollphase: Auftreten der Ovulation nach dem gemessenen LH-Maximum des präovulatorischen LH-Peaks

Parameter	Phase	Hündin					$\bar{x}_g(SF^{\pm 1})$
		Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
Zeitspanne vom Maximum des LH-Peaks bis zur Ovulation	VA-L	96		56	56	54	63,50*(1,32)
	K-L	72	88	64	0	54	29,38*(6,67)

Auch der Zeitpunkt der Ovulation (siehe Kapitel 4.1.3) nach Erreichung des präovulatorischen LH-Maximums zeigte keinen Unterschied zwischen den Läufigkeiten der Versuchs- und Kontrollphase.

Nach der ersten Injektion mit Estradiolbenzoat am Tag 0 waren die ersten Anzeichen einer proöstrischen Blutung im Mittel nach  $3,7 \pm 1,6$  Tagen zu sehen.

#### 5.2.6. Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen

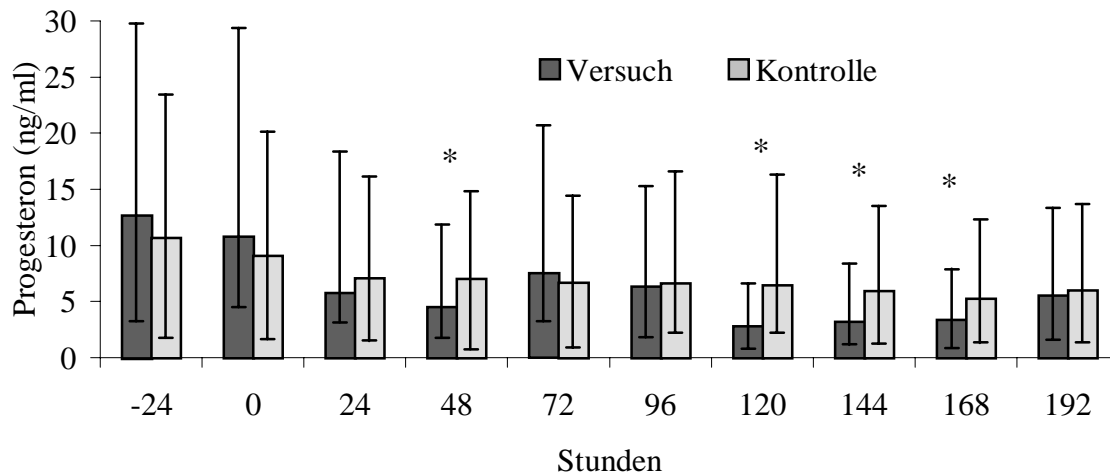
Der Vergleich der Progesteronkonzentrationen während des Diöstrus zeigt, daß sich die Progesteronsekretionen (gemessen an der AUC) im Diöstrus nach den Läufigkeiten der Versuchs- und Kontrollphase nicht unterscheiden ( $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Progesteronsekretion (AUC) nach den Läufigkeiten der Versuchs- und Kontrollphasen (Tag 0 bis 34 nach der Ovulation)

Parameter	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
		Jeani	Sally	Billi	Pebbels	Lena	
AUC (ng*ml <sup>-1</sup> *h)	nach V <sub>A</sub> -L	965	808	987	1157	934	970±(125)
	nach K-L		929	916	1173	1422	1110±(239)

Auch auf die Länge des Diöstrus hatten die Versuchsphasen V<sub>D</sub> (Tag 50 nach Beginn der proöstrischen Blutung) keinen meßbaren Einfluß. So lag die mittlere Diostrusdauer bei Zyklen mit Versuchsphase bei  $75,75 \pm 16,0$  Tagen ( $n=4$ ) und bei  $62,0 \pm 9,8$  Tagen ( $n=3$ ) bei Zyklen mit Kontrollphase ( $p > 0,05$ ).

Beim Vergleich der Progesteronwerte der Versuchs- und Kontrollphase im Diöstrus zeigten sich bei 4 von 8 Meßzeitpunkten in der Versuchsphase signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Werte als in der Kontrolle, ab der 120. Stunden nach der ersten Injektion ist dies für 3 aufeinanderfolgende Meßpunkte der Fall. Der Verlauf der Progesteronwerte ist in Abb. 24 wiedergegeben.



\* Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollphase

Abb. 24: Verlauf von Progesteron im Plasma während der Versuchs- und Kontrollphase im Diöstrus (0 = Zeitpunkt der Behandlung)

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Berechnung der AUC als Maß für die Progesteronsekretion für den Zeitraum 0 bis 192 Stunden der Versuchs- und Kontrollphase im Diöstrus wiedergegeben.

Tabelle 16: Progesteronsekretion (AUC) während der Versuchs- und Kontrollphasen im Diöstrus (0 bis 192 Stunden nach der ersten Injektion)

Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
	Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
Versuch	772,44	1092,36	1067,04	1006,80	1594,80	1106,69 $\pm$ (300,72) <sup>a)</sup>
Kontrolle	1002,96	1125,36	1277,28	1458,96	1641,84	1301,28 $\pm$ (255,62) <sup>b)</sup>

<sup>a) b)</sup> Unterschiede mit  $p < 0,05$  signifikant

Die mittlere AUC der Versuchsphase weist einen signifikant ( $p < 0,04$ ) niedrigeren Wert auf als die Kontrollphase.

Die Kontrolluntersuchungen ergaben weiterhin, daß sich die Länge des Anöstrus der den jeweiligen Läufigkeiten vorausgehenden Versuchs- und Kontrollphasen sich nicht unterscheidet. Die Ergebnisse, Tage nach Progesteron <1 ng/ml Plasma bis Beginn pro-östrische Blutung, sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Länge des Anöstrus während der Versuchs- bzw. Kontrollphase

Hund	Anöstruslänge (Tage)	
	Versuchsphase	Kontrollphase
Jeani	46/44	41
Sally	77	77/78
Billi	82	77
Lena	83	103
Pebbels	115	141
Mittelwert	80,2 (80,6)	87,8 (88,0)
Standardabw.	25,2 (24,5)	37,0 (37,0)

### 5.2.7. Vaginaler Widerstand

Der Verlauf des vaginalen Widerstandes während der Versuchsphasen  $V_A$ ,  $V_D$  und  $V_{Ka}$  ist in Abb. 25 dargestellt.

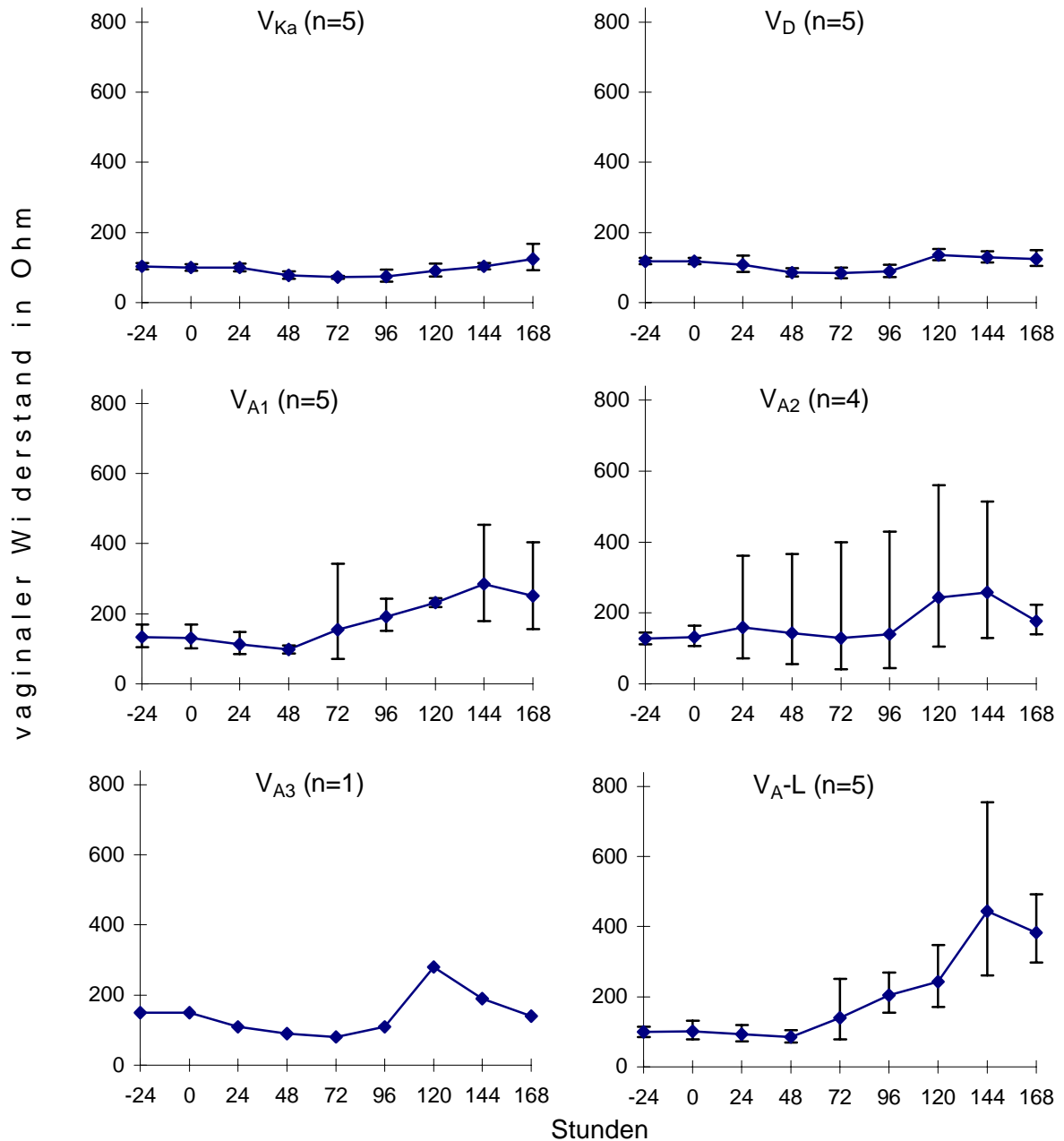


Abb. 25: Vaginaler Widerstand (Ohm) Geometrischer Mittelwert und Streufaktor der einzelnen Versuchsphasen  
(0 = Zeitpunkt der ersten Behandlung mit Estradiolbenzoat)

Die für die AUC und Maximalwerte (siehe Kapitel 4.2) der Versuchsphasen erhaltenen Werte sind in Tabelle 18 zusammengefaßt und graphisch in Abb. 26 dargestellt.

Tabelle 18: Parameter zur Charakterisierung des vaginalen Widerstandes während der Versuchsphasen: Maximalwert und AUC

Parameter	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
		Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
AUC	V <sub>A1</sub>	42960	30360	33240	41880	32640	36216 $\pm$ ( 5777) <sup>a)</sup>
	V <sub>A2</sub>		107040	25080	22920	21480	44130 $\pm$ (41966)
	V <sub>A3</sub>					27720	27720
	V <sub>A-L</sub>	62136	46080	49680	29760	30480	43627 $\pm$ (13696) <sup>b)</sup>
	V <sub>D</sub>	20520	22080	20160	19080	23280	21024 $\pm$ ( 1657) <sup>c)</sup>
	V <sub>Kast</sub>	17280	17520	16320	16920	20520	17712 $\pm$ ( 1633) <sup>d)</sup>
Maximum	V <sub>A1</sub>	650	260	220	610	330	414 $\pm$ (202) <sup>e)</sup>
	V <sub>A2</sub>		830	250	190	150	355 $\pm$ (319)
	V <sub>A3</sub>					280	280
	V <sub>A-L</sub>	999	470	930	290	390	616 $\pm$ (326) <sup>f)</sup>
	V <sub>D</sub>	150	140	130	140	160	144 $\pm$ ( 11) <sup>g)</sup>
	V <sub>Kast</sub>	110	160	100	110	180	132 $\pm$ ( 36) <sup>h)</sup>

a) b) c) d) e) f) g) h) Unterschied mit  $p < 0,01$  (a/d; b/c; b/d; c/d;) bzw. 0,05 (a/c; e/g; e/h; f/g; f/h) gesichert

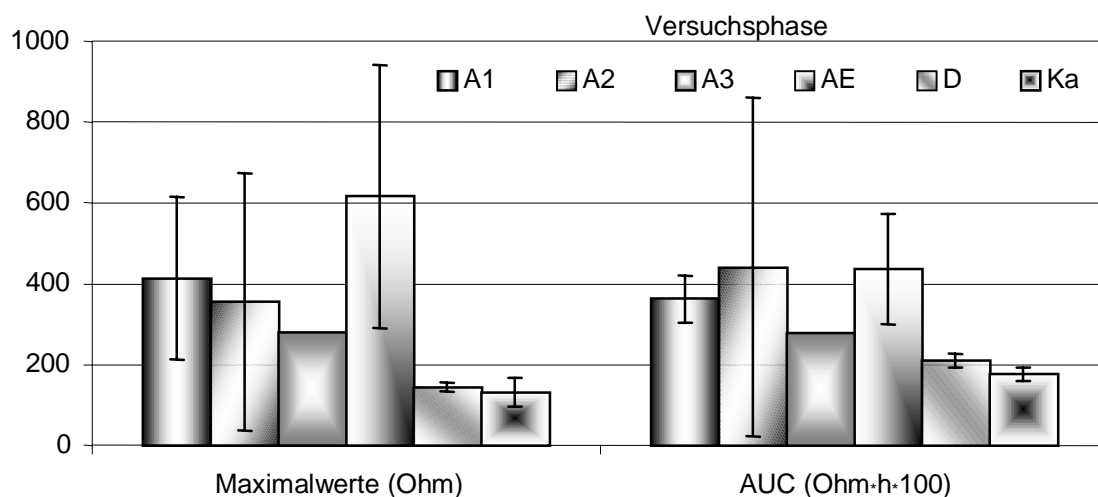


Abb. 26: Mittlerer Verlauf ( $\bar{x} \pm SD$ ) der Parameter Maximalwert und AUC der Vaginalspannung während der Versuchsphasen

Nach Anwendung der in Kap.4.2 beschriebenen statistischen Verfahren ergaben sich für die erhobenen Parameter folgende Ergebnisse:

Maximalwerte: In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter Effekt des Zyklusstadiums, das heißt - wie aus Abb. 26 ersichtlich - werden höhere Maximalkonzentrationen im Anöstrus als im Diöstrus oder nach Kastration gemessen.

AUC: In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ein hochsignifikanter Effekt des Zyklusstadiums, das heißt - wie aus Abb. 26 ersichtlich - ist eine höhere AUC im Anöstrus im Vergleich zum Diöstrus und nach Kastration festzustellen.

Tabelle 19 enthält die entsprechenden Angaben für die Läufe der Versuchs (V<sub>A</sub>-L)- und Kontrollphasen (K-L). Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede errechnen.

Tabelle 19: Parameter zur Charakterisierung des vaginalen Widerstandes während der Läufe V<sub>A</sub>-L und K-L: Maximalwert und AUC

Parameter	Phase	Hündin					$\bar{x} \pm (SD)$
		Jeani	Sally	Billi	Lena	Pebbels	
AUC	K-L	64800	59760	42960	84504	143160	79037±38786
	V <sub>A</sub> -L	68760		64800	86760	106080	81600±18912
Maximum	K-L	590	410	380	670	980	606±242
	V <sub>A</sub> -L	630		930	610	940	777±182

## 6. Diskussion

Ziel der Untersuchungen war es, die Bedeutung der negativ und positiv rückkoppelnden Mechanismen von Estradiol-17 $\beta$  an der endokrinen Steuerung des Anöstrus der Hündin näher zu definieren. Die Bearbeitung dieser Fragestellung erforderte ein komplexes Versuchsdesign sowie die Anwendung entsprechender Analysenverfahren zur Erfassung wichtiger, an der endokrinen Regulation beteiligter Regelfaktoren.

### 6.1. Versuchsdesign und Methodik

Der Fragestellung sollte durch Verabreichung von Estradiol-17 $\beta$  zu definierten Zeitpunkten des Anöstrus und Erfassung der LH-Sekretion nachgegangen werden. Dabei erfolgte die Orientierung im Hinblick auf die zu verabreichende Estradiol-17 $\beta$ -Dosis an der bekannten proöstrischen Estradiolsekretion, so daß auf Dosisfindungsversuche verzichtet wurden. In Orientierung an Gerres (1991) wurde Estradiol-17 $\beta$  in Form von Estradiolbenzoat verabreicht, wobei das dafür zur Verfügung stehende Arzneimittel Menformon<sup>®</sup>-K zuvor zur genaueren Dosierbarkeit mit Olivenöl verdünnt worden war. Wie aus Kapitel 5.2.1 Abb. 6 hervorgeht, konnte durch die gewählte Vorgehensweise ein weitgehend der endogenen proöstrischen Estradiol-17 $\beta$ -Sekretion entsprechendes Verlaufsmuster erreicht werden.

Um den Zeitraum des Anöstrus möglichst vollständig abzudecken, begannen die Behandlungen im Anöstrus nachdem die Progesteronwerte im peripheren Plasma auf Werte kleiner 1 ng/ml abgefallen waren und weitere 7 Tage zugewartet wurde (siehe Kapitel 3.2.2). Die Behandlungen wurden in 5-wöchigen Abständen bis zum Einsetzen der nächsten Läufigkeit fortgesetzt. Die Hündinnen dienten dabei als ihre eigene Kontrolle, d. h. zu identischen Zeitpunkten erfolgten in einem darauffolgenden Reproduktionszyklus die Behandlungen mit dem Vehikel, d.h. Olivenöl. Das Versuchsdesign sah weiterhin vor, daß bei allen Tieren eine weitere Behandlung während des Diöstrus (Versuchs- und Kontrollphase) sowie nach Kastration erfolgte. Dies sollte zunächst der Vergleichbarkeit der im Anöstrus erzielten Effekte dienen. Durch die Einfügung der Versuchs- und Kontrollphase im Diöstrus war es weiterhin möglich, den Effekt der Behandlung auf das Hypothalamus-Hypophysensystem unter gleichzeitigem Einfluß von Progesteron bei noch relativ hoher Verfügbarkeit von LH (Schneider et al.

1993) darzustellen. Anhand der Versuche nach Kastration konnte die von ovariellen Steroiden unbeeinflusste Reaktion des Hypothalamus-Hypophysensystems auf die Behandlung dargestellt werden. Gleichzeitig war es möglich, über den zu erwartenden LH-Anstieg *post castrationem* und die hier verstärkt auftretende negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiolbenzoat (Concannon et al. 1979a), auf die Funktionalität der Hypothalamus-Hypophysenachse der in den Versuch genommenen Hündinnen zu schließen. Dieser Effekt zeigte sich bei allen 5 Tieren, so daß aus dieser Hinsicht alle Daten uneingeschränkt in die statistische Auswertung einbezogen werden konnten.

Die Charakterisierung der LH-Freisetzung erfolgte durch Bestimmung der LH-Konzentrationen in Blutproben, die über einen definierter Zeitraum (Kontroll- bzw. Versuchsphase) zu bestimmten Zyklusstadien entnommen wurden. Die Blutentnahmeintervalle lagen nach der ersten Estradiolbenzoatinjektion während der folgenden 24 Stunden bei 6 Stunden, danach bis zum Ende der Versuchs- bzw. Kontrollphase nach 168 Stunden (7 Tage) bei 8 Stunden. Der Festlegung dieser Zeitspanne lag die Überlegung zugrunde, daß die festgelegte Versuchsphase in etwa den Zeitraum der proöstrischen Estradiolsekretion mit nachfolgendem präovulatorischem LH-Peak erfaßt. In Hinblick auf die Dauer der Versuchsphase wurde davon ausgegangen, daß trotz der Blutentnahmeintervalle von 6 bzw. 8 Stunden bei insgesamt 23 Blutentnahmen auf die Pulsatilität der LH-Freisetzung geschlossen werden kann.

Im Verlauf der Versuchsdurchführung zeigte sich bereits bei der ersten Hündin während der letzten Versuchsphase im Anöstrus (Behandlung mit Estradiolbenzoat) eine Läufigkeit. Dies führte zu einer Erweiterung der Versuchsplanes, indem abweichend von dem oben dargelegten Blutentnahmeschema bei den ersten Anzeichen einer Läufigkeit die Blutentnahmen in 8 stündigen Intervallen solange weitergeführt wurden, bis die parallel gemessenen Progesteronkonzentrationen einen Wert von  $> 3$  ng/ml Plasma erreicht hatten, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß die LH-Sekretion zu diesem Zeitpunkt wieder Basalwerte erreicht hatte. Daraus resultieren die Versuchsphasen V<sub>A</sub>-L und K-L (siehe Kapitel 3.1 und 5.2.5).

Teilweise war es nicht möglich, die ursprünglich eingeplante Chronologie der Versuchs- und Kontrollphasen einzuhalten. Aus diesem Grund mußten bei einigen Hündinnen Versuchs- bzw. Kontrollphasen zyklusverschoben durchgeführt werden (siehe Tabelle 1 und Tabelle 4). Für die weitere Auswertung der Versuche war dies jedoch ohne Bedeu-



tung, da durch die gewählten Abstände zwischen den Versuchsphasen von 5 Wochen und die Halbwertszeit von Estradiolbenzoat von  $15,9 \pm 3,9$  Stunden (abgeleitet aus dem Verlauf in Abb. 6) nicht zu erwarten war, daß eine über die eigentliche Versuchsphase hinausgehende Beeinflussung des Hypothalamus-Hypophysensystem eintritt.

Parallel zu LH wurde in allen Proben der Versuchs- und Kontrollphasen Estradiol-17 $\beta$  gemessen. Die Bestimmung von Progesteron zur Kontrolle des Zyklusverlaufes beschränkte sich auf 2 bis 3 Bestimmungen pro Woche. Während der Läufigkeiten und der Versuchs- bzw. Kontrollphasen im Diöstrus wurde zusätzlich in der täglichen 8 Uhr Probe die Progesteronkonzentration bestimmt. Dies war notwendig, um den Ovulationszeitpunkt in den Läufigkeiten zu bestimmen.

Als eine für die statistische Auswertung problematische Tatsache stellte sich die unterschiedliche Anöstruslänge der einzelnen Hündinnen dar. Dies führte dazu, daß lediglich die Versuchs- und Kontrollphasen Diöstrus bzw. Anöstrus 1 und 2 der statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller Varianzanalyse unterzogen werden konnten. Dieser Mangel wurde jedoch durch die Trendanalyse, die alle Anöstrusphasen einbezog, weitgehend kompensiert. In die Trendanalyse konnten allerdings nicht die Werte der Hündin Jeani einfließen da in diesem Fall nur eine Anöstrusphase in der Kontroll- und Versuchsphase vorhanden war.

Während die Bestimmung von Progesteron und Estradiol-17 $\beta$  mit etablierten radioimmunologischen Messverfahren erfolgte, wobei alle an die Zuverlässigkeit der Methodik gestellten Ansprüche erfüllt wurden (siehe Kapitel 3.3.1.1.2 und 3.3.1.2.2), mußte für die Bestimmung von LH auf einen eigens dazu etablierten Radioimmunotest im Labor von Prof. Dr. D. Schams, Forschungszentrum Lebensmittel, Weihenstephan, zurückgegriffen werden. Es handelte sich um einen heterologen Test, wobei als Standard canines LH eingesetzt wurde und auch der erste Antikörper gegen canines LH gerichtet war; als Tracer diente  $^{125}\text{I}$  markiertes bovines LH. Gemessen am Intra- und Interassayvariationskoeffizient sowie an der Wiederfindung von LH konnte die Zuverlässigkeit des Tests bestätigt werden (siehe Kapitel 3.3.2.4).

## 6.2. Diskussion der Ergebnisse

In Bestätigung früherer Untersuchungen (Hoffmann et al. 1996, Riesenbeck 1997, Concannon et al. 1980) haben die erhaltenen Ergebnisse - gemessen an den LH-Maximalwerten, der AUC und den LH-Basalwerten - klar bestätigt, daß die Verfügbarkeit von LH im Blut beim Übergang vom Diöstrus zum Anöstrus abnimmt, um dann im Verlauf des Anöstrus wieder allmählich anzusteigen.

Eher gegenläufig verhält sich die Anzahl der erfaßten Peaks, die im Übergang vom Diöstrus zum Anöstrus zunächst ansteigt, dann jedoch im Verlauf des Anöstrus wieder abfällt. Dieser Befund ist jedoch trotz der Dauer der Blutentnahmephase und Anzahl der entnommenen Proben kritisch zu werten, da Pulse von kurzer Zeitdauer nicht als solche erkannt werden konnten.

Gemessen an den LH-Maximalwerten sowie der AUC ergaben sich hochsignifikante Behandlungseffekte (Vergleich Versuchs- und Kontrollphasen Diöstrus, Anöstrus 1, Anöstrus 2; siehe Tabellen 6 und 7 sowie Abb. 12). Diese Effekte, die sich in einer Erniedrigung der durchschnittlichen LH-Maximalwerte und der AUC nach Verabreichung von Estradiolbenzoat zeigen, sind insbesondere im Diöstrus darstellbar. Hier führte die negativ rückkoppelnde Wirkung auf die LH-Freisetzung auch zu einer temporären Erniedrigung der Progesteronsekretion (siehe Abb. 24).

In den Phasen Anöstrus 1 und Anöstrus 2 ist die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  nicht (AUC, Anöstrus 1) oder deutlich schwächer ausgeprägt. Wie aus Abb 12 hervorgeht, zeigt sich bei der Hündin Pebbels, bei der als einziger die Phase Anöstrus 3 vorhanden ist, daß sich der Behandlungseffekt im Verlauf des Anöstrus verstärkt.

Die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  wird demnach insbesondere bei einem relativ hohem Ausgangsniveau der LH-Sekretion deutlich, wie dies im Diöstrus und nach Kastration der Fall ist. Bei der bereits abgefallenen Sekretion von LH im Anöstrus erscheint dieser Effekt zwar reduziert, ist aber immer noch eindeutig meßbar. Diese negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  zeigt sich auch noch eindeutig in der Versuchsphase Anöstrus 3, auch wenn aufgrund der Fallzahlen eine statistische Überprüfung nicht mehr möglich war.

Für die Basalwerte konnte die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  lediglich im Diöstrus dargestellt werden.

Einer besonderen Betrachtung bedarf der Parameter "1. Peak nach Behandlungsbeginn". Die LH-Freisetzung ist durch Pulsatilität gekennzeichnet, die sich auch nicht während der Periode des Anöstrus verliert (Hoffmann et al. 1996, Riesenbeck 1997). Nach der Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  konnte in allen Versuchsphasen eine signifikante zeitliche Verzögerung des Auftretens des ersten LH-Peaks nach Behandlungsbeginn festgestellt werden, wobei dieser Effekt im Anöstrus deutlicher ausgeprägt war als im Diöstrus (siehe Abb. 12).

Diese Beobachtungen belegen, daß die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  ein wesentlicher Faktor bei der Kontrolle des Anöstrus der Hündin ist und auch während des Diöstrus Einfluß auf die LH-Sekretion nimmt.

Wie die Untersuchungen während der Kontrollphasen zur Verfügbarkeit von Estradiol-17 $\beta$  im Blut gezeigt haben, konnte insbesondere am Beispiel der AUC und der Basalwerte ein signifikanter Zeiteffekt nachgewiesen werden, d. h. vom Diöstrus zum Anöstrus hin war ein deutlicher Abfall festzustellen, im Verlaufe des Anöstrus bestätigte die Trendanalyse dann einen erneuten Anstieg. Der in diesen Untersuchungen erkennbare allmähliche und parallele Anstieg in der Verfügbarkeit von LH und Estradiol-17 $\beta$  im Verlauf des Anöstrus zeigt, daß - unbeschadet der deutlich ausgeprägten negativ-rückkoppelnden Wirkung von exogen zugeführtem Estradiol-17 $\beta$  - bei unbeeinflussten Tieren die negativ-rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  im Sinne einer Desensibilisierung im Verlauf des Anöstrus offensichtlich abnimmt, ein Vorgang wie er vor allem in der Pubertät vor dem ersten Zyklus (Huffman et al. 1987, Meijs-Roelofs et al. 1983, Dodson et al. 1988) und auch bei der Beendigung des Anöstrus beim Schaf beobachtet wurde (Goodman und Knobil 1981). Erklärungen werden in der Verminderung der Östrogen-Rezeptorkonzentrationen im Hypothalamus-Hypophysensystems gesucht (Day et al. 1987). Bei der Hündin steigt allerdings im Verlauf des Anöstrus die Expression der mRNA des Östrogenrezeptors im mediobasalen Hypothalamus und ist positiv korreliert mit den LH-Plasmakonzentrationen (Tani et al. 1997). Dies muß allerdings kein Widerspruch sein, da wie in Kapitel 2.1.6.1.2 dargestellt wurde,

Estradiol-17 $\beta$  in den verschiedenen Regionen des Hypothalamus-Hypophysensystems unterschiedliche Wirkungen hat und auch Einfluß auf die GnRH-Sekretion hemmenden Neurotransmitter nimmt (Jarry et al. 1991; Jarry et al. 1992).

Ungeklärt ist aber weiterhin, welche Mechanismen zur Umstellung von der negativen auf die positiv-rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  führen. Bei allen 5 Hündinnen entwickelte sich unmittelbar an die letzte Versuchsphase im Anöstrus (V<sub>A</sub>-L) eine Läufigkeit, d. h. innerhalb von 2-7 Tagen nach der letzten Behandlung mit Estradiolbenzoat setzte die proöstrische Blutung ein. Für die LH-Freisetzung während der ersten 168 Stunden der als V<sub>A</sub>-L bezeichneten Versuchsphase gilt, wie aus Abb. 12 hervorgeht, daß sich der Trend in der Charakteristik der Verfügbarkeit von LH der drei vorausgehenden Anöstrusperioden A1, A2, A3 fortsetzt. Die hier beobachteten Läufigkeiten wiesen einen weitgehend physiologischen Verlauf auf, unterschieden sich aber von denen der Kontrollphase durch eine erniedrigte präovulatorische LH-Ausschüttung, gemessen an der AUC und den Maximalwerten ( $p < 0,05$ ). Diese Aussage bestätigte sich auch bei der Erweiterung des Beobachtungszeitraumes von -112 Stunden bis +52 Stunden, orientiert am Zeitpunkt der maximalen LH-Freisetzung (siehe Abb. 23 u. 24). Unbeschadet dieser Unterschiede waren Verlauf und Dauer der Progesteronsekretion im darauffolgenden Diöstrus, wie aus Tabelle 15 hervorgeht, nicht unterschiedlich.

Die hier zugrunde liegenden Mechanismen müssen wahrscheinlich in der stimulierenden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  auf die Synthese der eigenen und der GnRH-Rezeptoren im Hypophysenvorderlappen gesehen werden (siehe auch Clarke et al. 1988).

Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen müssen die Befunden zur Veränderung der Leitfähigkeit der Vaginalschleimhaut gesehen werden. Wie Abb. 25 zeigt, konnten nach Kastration und im Diöstrus keine oder nur schwach meßbaren Veränderungen der Leitfähigkeit nachgewiesen werden, im Anöstrus aber deutliche. Dieser Effekt der Erhöhung des elektrischen Widerstandes war am deutlichsten in der Phase V<sub>A</sub>-L ausgeprägt, wobei zum Zeitpunkt der Beendigung der Messungen das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht war.

Diese Befunde lassen darauf schließen, daß nach Kastration im Vaginalepithel so gut wie keine Östrogenrezeptoren vorhanden sind. Anders dagegen muß der Befund im Diöstrus interpretiert werden. Hier haben Untersuchungen am Uterus des Hundes gezeigt, daß in dem Zeitraum von Tag 30 bis 45 nach der Ovulation Östrogenrezeptoren eindeu-

tig nachweisbar sind, wenn auch die Konzentration niedriger als im Östrus und Anöstrus war (Hoffmann und Büttner 1998, Vermeirsch et al. 1999). Auf eine entsprechende Situation im Vaginalepithel kann geschlossen werden, zumal sich in der Vaginalschleimhaut der Frau beim Übergang von der Follikel- in die Lutealphase ähnliche Veränderungen abspielen. Auch während der Lutealphase der Frau sind deutliche weniger Östrogenrezeptoren in der Vaginalschleimhaut zu finden als in der Follikelphase (Sjoberg et al. 1989). Das „Nicht-reagieren“ auf die Behandlung mit Estradiolbenzoat im Diöstrus könnte demnach damit erklärt werden, daß die durch Progesteron „down regulierte“ Rezeptorkonzentration (Selcer und Leavitt 1988) noch unterhalb eines kritischen Niveaus liegt, oder aber, daß das noch vorhandene Progesteron die Expression der östrogenen Wirkung auf andere Weise hemmt (Leavitt et al. 1987).

Die im Anöstrus erhaltenen Werte weisen - analog der Situation bei präpubertären Tieren (Rangaraj und Gupta 1997, Yamashita et al. 1989) - auf das Vorhandensein einer reaktiven Grundkonzentration an Rezeptoren hin, wobei der signifikante Anstieg des elektrischen Widerstandes in der Versuchsphase VA-L auf eine bereits deutlich erhöhte Rezeptorkonzentration schließen läßt. Eine durch die Behandlung mit Estradiolbenzoat provozierte Stimulierung dieser Rezeptoren, deren erhöhtes Vorkommen auch auf zentralnervöser Ebene zu unterstellen ist (Tani et al. 1997), könnte dann Ausgangspunkt der beobachteten positiven Rückkopplung sein, wobei der präovulatorischen LH-Freisetzung zunächst eine erhöhte endogene Synthese von Estradiol-17 $\beta$  vorausging.

Der Effekt des Auftretens einer Läufigkeit noch während oder nach einer Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  scheint an die terminale Phase des Anöstrus gebunden zu sein, da – wie die Progesteronmessungen ergaben – sich grundsätzlich kein Unterschied in der Anöstruslänge zwischen der Versuchs- und Kontrollphase ergab. Ob es sich nun tatsächlich um induzierte Läufigkeiten handelte, kann auf Grund dessen nicht gesagt werden, dafür spricht aber das im Vergleich zur Kontrolle veränderte LH-Sekretionsmuster (s.o.).

Die Auslösung einer fertilen Läufigkeit ist zu jedem Zeitpunkt des Anöstrus mit Prolaktinantagonisten - z.B. Cabergolin - möglich, wobei sich allerdings mit Annäherung an das physiologische Ende des Anöstrus die dazu notwendige Behandlungsdauer verkürzt (Verstegen et al. 1999). Diese Beobachtung läßt einen Zusammenhang mit den eigenen Befunden erkennen und weist auf eine Interaktion zwischen Prolaktin und

Estradiol-17 $\beta$  hin. Die Beantwortung dieser Frage fordert jedoch weiterführende Untersuchungen.

## **7. Zusammenfassung**

Die der neuroendokrinen Regulation der Fortpflanzung der Hündin zugrunde liegenden Mechanismen, insbesondere während des Anöstrus, sind noch weitgehend unbekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Informationen über die Bedeutung der negativ und positiv rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  als Faktor der neuroendokrinen Steuerung des Anöstrus zu erhalten.

Die Untersuchungen wurden an 5 geschlechtsgesunden Beagle Hündinnen im Alter von 1 – 3 Jahren durchgeführt. In Anlehnung an die Verhältnisse während der Läufigkeit wurde Estradiol-17 $\beta$  so verabreicht, daß eine weitgehend dem proöstrischen Verlauf der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen entsprechende Kurve erreicht wurde (d.h. subcutane Verabreichung von 1; 1,5; 5 und 5 mg Estradiolbenzoat/kg KGW zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 48 Stunden). Die Behandlungen im Anöstrus begannen 7 Tage nachdem die Progesteronkonzentration auf Werte <1 ng/ml Plasma abgefallen war. Sie wurden in 5-wöchigen Abständen bis zu Einsetzen der Läufigkeit wiederholt. Ergänzend wurde eine weitere Behandlung im Diöstrus (Tag 50 nach Beginn der proöstrischen Blutung) sowie nach Kastration der Hündinnen durchgeführt. Nach der ersten Injektion mit Estradiolbenzoat erfolgten die Blutentnahmen vier Mal in 6-stündigen und danach bis zur 168sten Stunde in 8-stündigen Abständen; diese Zeitabschnitte wurden als Versuchsphasen bezeichnet. Die Hündinnen dienten als ihre eigenen Kontrollen, d.h., in einem anderen Reproduktionszyklus wurde zu identischen Zeitpunkten Vehikel verabreicht und über den entsprechenden Zeitraum Blutproben entnommen; diese Zeitabschnitte wurden als Kontrollphasen bezeichnet. Die Länge der Versuchs- und Kontrollphasen war entsprechend der Dauer der proöstrischen Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung und des nachfolgenden präovulatorischen LH-Peaks festgelegt worden.

Bei allen mit Estradiol-17 $\beta$  behandelten Tieren schloß sich unmittelbar an die letzte Versuchsphase im Anöstrus eine Läufigkeit an. In diesen Fällen wurden die Blutprobenentnahmen bis zum Erreichen einer Progesteronkonzentration von >3 ng/ml Plasma fortgeführt. Im Falle der Kontrollen erstreckten sich die Blutentnahmen bei Hündinnen die läufig geworden waren vom 1. Tag der proöstrischen Blutung bis Progesteronkonzentrationen >3 ng/ml Plasma gemessen wurden.

Die Bestimmung von LH, Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron erfolgte mittels validierter radioimmunologischer Verfahren. LH und Estradiol-17 $\beta$  wurde in allen Proben der Versuchs- und Kontrollphasen gemessen, Progesteron in den täglichen 8 Uhr-Proben der Versuchs- und Kontrollphasen im Diöstrus und den Läufigkeiten sowie zwei mal wöchentlich während des gesamten Versuchszeitraumes zur Darstellung der ovariellen Aktivität. In Ergänzung zu diesen Untersuchungen wurde die elektrische Leitfähigkeit der Vaginalschleimhaut bestimmt. Zur Charakterisierung der LH-Freisetzung wurden die Maximalwerte, die Area Under Curve (AUC), die Basalwerte, die Anzahl der Peaks sowie der erste Peak nach Behandlungsbeginn erfaßt. Die Quantifizierung der Estradiol-17 $\beta$ -Freisetzung während der Kontrollphasen erfolgte ebenfalls durch Berechnung der AUC, der Basalkonzentrationen, der Maximalwerte sowie der Anzahl der Peaks. Auch für die Verlaufskurven des elektrischen Widerstandes im Vaginalepithel wurden die AUC und Maximalwerte errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ein- und zweifaktorieller Varianzanalyse, der Trendanalyse und – soweit angebracht – mittels t-Test.

Gemessen an der AUC und den Maximalwerten ergaben sich hochsignifikante Zeit- und Behandlungseffekte für die Freisetzung von LH. So führte die Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  im Vergleich zu Kontrolle zu allen Messzeitpunkten des Zyklus zu einer Erniedrigung der LH-Freisetzung; diese fiel vom Diöstrus zum Anöstrus ab, um dann im Verlauf des Anöstrus allmählich wieder anzusteigen, begleitet von einem, in den Kontrollphasen gemessen, parallelen Anstieg der Verfügbarkeit von Estradiol-17 $\beta$ . Durch die Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  kam es zu keinen meßbaren Verschiebungen im Zyklusverlauf. Die im Anschluß an die letzte Versuchsphase im Anöstrus unmittelbar auf die Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  auftretenden Läufigkeiten können mit gewissen Vorbehalten als induziert bezeichnet werden, zumal sich die präovulatorische LH-Freisetzung von der der Läufigkeiten der Kontrollphase unterscheidet. Daraus ergibt sich, daß die negativ rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  ein wesentlicher und anhaltender Regelfaktor im Hinblick auf die Länge des Anöstrus ist. Unbeschadet der offensichtlich stattfindenden Desensibilisierung des Hypothalamus-Hypophysensystems (paralleler Anstieg der Verfügbarkeit von LH- und Estradiol-17 $\beta$  im Blut) im Verlauf des Anöstrus zeigt sich der Wechsel zur positiv rückkoppelnden Wirkung erst unmittelbar am Ende des Anöstrus.



Wie die Untersuchungen zur Veränderung des elektrischen Widerstandes in der Vaginalschleimhaut nahe legen, scheint die Verfügbarkeit von Östrogenrezeptoren im Vaginalepithel eine wesentliche Rolle zu spielen, da im Anöstrus – insbesondere in der unmittelbar der Läufigkeit vorausgehenden Phase – nicht jedoch nach Kastration bzw. im Diöstrus Veränderungen in der Leitfähigkeit des Vaginalsekretes dargestellt werden konnten.

Bei allen in den Versuch aufgenommenen Tieren kann eine volle Funktionalität der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse unterstellt werden, da sich nach Kastration der erwartete Anstieg der LH-Freisetzung und nach Behandlung mit Estradiol-17 $\beta$  eine deutlich negativ rückkoppelnde Wirkung zeigten.

## 8. Summary

### **Investigations on the reestablishment of the positive feedback of estradiol-17 $\beta$ and the secretion of estradiol-17 $\beta$ during anoestrus of the bitch**

The mechanisms involved in the neuroendocrine regulation of the reproduction of bitches, especially in respect to anoestrus, are still largely unknown. The objective of the work presented, therefore has been to elaborate information on the relevance of both, the negative and positive feedback of estradiol-17 $\beta$  as factors of neuroendocrine regulation of the anoestrus.

The experiments were carried out using 5 sexually healthy beagle bitches at the age of 1 - 3 years.

With reference to the situation during heat an application scheme for estradiol-17 $\beta$  was used resulting in a concentration curve close to that of proestrous estradiol-17 $\beta$  concentrations. This was achieved by subcutaneous application of 1, 1.5, 5 and 5 mg estradiol-benzoate/kg b.w., respectively at times 0, 12, 24 and 48 hours. The applications within the anoestrus started 7 days following the decrease of plasma progesterone concentrations to levels < 1 ng/ml. They were repeated in 5 weeks intervals unto onset of heat. Additionally treatments were performed during the dioestrus (day 50 following onset of proestrous bleeding) and after castration of the bitches. With reference to the first estradiol-benzoate injection 4 blood samples were taken in 6 hours intervals and then until the 168. hour in 8 hour intervals. These periods are characterised as experimental phases. The bitches served individually as their own controls: in another reproduction cycle, only the vehicle was administered using the identical time regime for dosing and blood sampling. These periods are characterised as control phases. The duration of the experimental and the control phases had been fixed according to the duration of proestrous estradiol-17 $\beta$  release and the following pre-ovulatory LH-peak.

All animals treated with estradiol-17 $\beta$  developed heat immediately after the last experimental phase during the anoestrus. In these experiments blood sampling was continued until plasma progesterone levels were >3ng/ml. Blood sampling with bitches

coming to heat during controls was performed from day 1 of proestrous bleeding until plasma progesterone levels were found  $>3$  ng/ml.

LH, estradiol-17 $\beta$ , and progesterone were analysed using validated radioimmunoassay methods. LH and estradiol-17 $\beta$  concentrations were determined in all samples taken during the experimental and control phases. Progesterone was analysed for in the daily 8 o'clock samples of the experimental and control phases during the dioestrus and heat, and additionally two times weekly for the whole duration of the experimental work to assess ovarian activity. These analyses were complemented by the measurement of the electric conductivity of the vaginal mucosa.

LH release was characterised by its maximal value, the Area Under Curve (AUC), the basal levels, the number of peaks, and the time to first peak following treatment.

Estradiol-17 $\beta$  release during the control phases was quantified upon calculation of the AUC, the basal levels, the maximal levels, and the number of peaks.

To establish the course of the electrical conductivity in the vaginal epithelium, the AUC and the maximal values were calculated, too.

The statistical evaluation included mono- and bi-factorial analysis of variance, trend analysis and - when appropriate - the t-test.

The assessment of the AUC and the maximal levels resulted in highly significant time and treatment effects for the parameter LH release. As compared to the control, treatment with estradiol-17 $\beta$  resulted at any time of sampling within the cycle in a decrease in LH release. It decreased from dioestrus to anoestrus to slowly increase in the course of the anoestrus, and was paralleled by an increase of estradiol-17 $\beta$  availability detected in the control phases. The application of estradiol-17 $\beta$  did not lead to a detectable shift in the course of the cycle. The heats observed following the last experimental phase in the anoestrus immediately after estradiol-17 $\beta$  treatment may be attributed with certain reservation to induction, especially since the pre-ovulatory LH release is different from that of the "regular" heat. This demonstrates that the negative feedback effect of estradiol-17 $\beta$  is an important and sustaining regulator for the duration of the anoestrus.

Irrespective of the obvious desensibilisation of the hypothalamic-hypophyseal system (simultaneous increase of the availability of LH and estradiol-17 $\beta$  in the blood) in the course of the anoestrus the change to the positive feedback mechanism becomes obvious only shortly to the end of the anoestrus.

From the experiments on changing of the electrical conductivity in the vaginal mucosa it may be concluded that the availability of estrogen receptors in the vaginal epithelium plays an important role: during the anoestrus - especially the cycle phase immediately preceding heat - changes in the conductivity of the vaginal secreta could be demonstrated, which was not the case after castration and during the dioestrus.

For all animals used in the experiments the complete functionality of the hypothalamic-hypophyseal-gonadal-axis may be granted since, after castration the expected increase of LH release, and following estradiol-17 $\beta$  treatment a remarkable negative feedback occurred both.

## **9. Literaturverzeichnis**

Abbot S.D., Docherty K., Clayton R.N.; (1988)

Regulation of LH subunit mRNA levels by gonadal hormones in female rats.  
J. Mol. Endocrinol. 1: 49-60

Adams T.E., Adams B.M.; (1986)

Gonadotrope function in ovariectomized ewes actively immunized against  
gonadotropin-releasing hormone (GnRH).  
Biol. Reprod. 35: 360-367

Alexander S., Irvine C.H.; (1982)

Radioimmunoassay and in-vitro bioassay of serum LH throughout the equine  
oestrous cycle.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 32: 253-60

Amoss M., Burgus R., Blackwell R., Vale W., Fellows R., Guillemin R.; (1971)

Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic  
luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 205-10

Armstrong J.D., Britt J.H., Cox N.M.; (1986)

Seasonal differences in function of the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis  
in weaned primiparous sows.  
J. Reprod. Fertil. 78: 11-20

Attia M.A.; (1989)

Thirteen-weeks subcutaneous treatment with oestradiol or an  
oestradiol/progesterone combination in the beagle bitches.  
Deutsche tierärztliche Wochenschrift 96: 399-498

Attia M.A., Zayed I.; (1979)

Cytological study on the anterior pituitary of beagle bitches treated  
subcutaneously with progesterone for 13 weeks.  
Arch. Toxicol. 42: 147-157

- Aurich C., Schlote S., Hoppen H.-O., Klug E., Hoppe H. Aurich J.E.; (1994)  
Effects of the opioid antagonist naloxone on release of luteinizing hormone in mares during the anovulatory season.  
J. Endocrinol. 142: 139-144
- Baird D.T., McNeilly A.S., Sawers R.S., Sharpe R.M.; (1979)  
Failure of estrogen-induced discharge of luteinizing hormone in lactating women.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49: 500-506
- Barb C.R., Kraeling R.R., Rampacek G.B., Whisnant C.S.; (1986)  
Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion in the postpartum sow.  
Biol. Reprod. 35: 368-371
- Barb C.R., Rampacek G.B., Kraeling R.R., Estienne M.J., Taras E., Estienne C.E., Whisnant C.S.; (1988)  
Absence of brain opioid peptide modulation of luteinizing hormone secretion in the prepubertal gilt.  
Biol. Reprod. 39: 603-609
- Barrell G.K., Moenter S.M., Caraty A., Karsch F.J.; (1992)  
Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe.  
Biol. Reprod. 46: 1130-1135
- Besognet B., Hansen B.S., Daels P.F.; (1996)  
Dopaminergic regulation of gonadotropin secretion in seasonally anoestrous mares.  
J. Reprod. Fertil. 108: 55-61
- Bethea C.L., Brown N.A., Kohama S.G.; (1996)  
Steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary.  
Endocrinology 137: 4372-4383

Bethea C.L., Widmann A.A.; (1998)

Differential expression of progesterin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques.

Endocrinology 139: 677-687

Bishop D.K., Wettemann R.P., Yelich J.V., Spicer L.J.; (1996)

Ovarian response after gonadotropin treatment of heifers immunized against gonadotropin-releasing hormone.

J. Anim. Sci. 74: 1092-1097

Bouchard G.F., Solorzano N., Concannon P.W., Youngquist R.S., Bierschwal C.J.; (1991)

Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and elisa for progesterone

Theriogenology 35: 603-611

Britt J.J., Esbenshade K.L., Ziecik A.J.; (1991)

Roles of estradiol and gonadotropin-releasing hormone in controlling negative and positive feedback associated with the luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs.

Biol. Reprod. 45: 478-485

Brooks A.N., Haynes N.B., Yang K., Lamming G.E.; (1986a)

Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in seasonally anoestrous mature ewes.

J. Reprod. Fertil. 76: 709-715

Brooks A.N., Lamming G.E., Lees P.S., Haynes N.B.; (1986b)

Opioid modulation of LH secretion in the ewe.

J. Reprod. Fertil. 76: 693-708

Brown B.W., Mattner P.E., Carroll P.A., Hoskinson R.M., Rigby R.D.; (1995)

Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in ewes.

J. Reprod. Fertil. 103: 131-135

Burgus R., Butcher M., Amoss M., Ling N., Monahan M., Rivier J., Fellows R., Blackwell R., Vale W., Guillemin R.; (1972)

Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 278-282

Cain J.L., Cain G.R., Feldman E.C., Lasley B.L., Stabenfeldt G.H.; (1988)

Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches.

Am. J. Vet. Res. 49: 1993-1996

Camacho-Arroyo I., Guerra-Araiza C., Cerbon M.A.; (1998)

Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain.

Neuroreport 9: 3993-3996

Camacho-Arroyo I., Pasapera A.M., Cerbon M.A.; (1996)

Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit.

Neurosci. Lett. 214: 25-28

Camacho-Arroyo I., Perez-Palacios G., Pasapera A.M., Cerbon M.A.; (1994)

Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 50: 299-303

Camp P., Barraclough C.A.; (1985)

Correlation of luteinizing hormone surges with estrogen nuclear and progestin cytosol receptors in the hypothalamus and pituitary gland. I. Estradiol dose response effects.

Neuroendocrinology 40: 45-53



Caraty A., Evans N.P., Fabre-Nys C.J., Karsch E.J.; (1995)

The preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 49: 245-255

Caraty A., Fabre-Nys C., Delaleu B., Locatelli A., Bruneau G., Karsch F.J., Herbison A.; (1998)

Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe.

Endocrinology 139: 1752-1760

Caraty A., Locatelli A., Martin G.B.; (1989)

Biphasic response in the secretion of gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol.

J. Endocrinol. 123: 375-382

Clarke I.J.; (1988)

Gonadotropin-releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen.

J. Endocrinol. 117: 355-360

Clarke I.J.; (1993)

Variable patterns of Gonadotropin-releasing hormone secretion during the estrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes.

Endocrinology 133: 1624-1632

Clarke I.J.; (1995)

Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in LH in the ewe.

J. Endocrinol. 145: 271-282

Clarke I.J., Cummins J.T.; (1984)

Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe.

Neuroendocrinology 39: 267-274

Clarke I.J., Cummins J.T.; (1985a)

GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes.

J. Reprod. Fertil. 73: 425-431

Clarke I.J., Cummins J.T.; (1985b)

Increased gonadotropin-releasing hormone pulse frequency associated with estrogen-induced luteinizing hormone surges in ovariectomized ewes.

Endocrinology 116: 2376-2383

Clarke I.J., Cummins J.T.; (1987)

The significance of small pulses of gonadotropin-releasing hormone.

J Endocrinol 113: 413-418

Clarke I.J., Cummins J.T., Crowder M.E., Nett T.M.; (1987)

Pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone in relation to changes in pituitary and plasma luteinizing hormone in ovariectomized-hypothalamo-pituitary disconnected ewes. I. Effect of changing frequency of gonadotropin-releasing hormone pulses.

Biol. Reprod. 37: 749-754

Clarke I.J., Cummins J.T., Crowder M.E., Nett T.M.; (1988)

Pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone in relation to changes in pituitary and plasma gonadotropins in ovariectomized hypothalamo/pituitary-disconnected ewes. II. A marked rise in receptor number during the acute feedback effects of estradiol.

Biol. Reprod. 39: 349-354

- Clarke I.J., Cummins J.T., Jenkin M., Phillips D.J.; (1989)  
The oestrogen-induced surge of LH requires a 'signal' pattern of gonadotropin-releasing hormone input to the pituitary gland in the ewe.  
J. Endocrinol. 122: 127-134
- Clarke I.J., Thomas G.B., Yao B., Cummins J.T.; (1987)  
GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle.  
Neuroendocrinology 46: 82-88
- Clarke I.J., Wynne K., Funder J.W., Findlay J.K.; (1982)  
Effects of 2-hydroxyoEstradiol-17 beta on plasma luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin, and nuclear translocation of pituitary oestrogen receptors in ovariectomized ewes.  
J. Endocrinol. 95: 19-27
- Claus R., Weiler U.; (1985)  
Influence of light and photoperiodicity on pig prolificacy.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 33: 185-197
- Collado M.L., Rodriguez-Manzo G., Cruz M.L.; (1985)  
Effect of progesterone upon adenylate cyclase activity and cAMP levels on brain areas.  
Pharmacol. Biochem. Behav. 23: 501-504
- Concannon P.W.; (1980)  
Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch.  
J. Reprod. Fertil. 58: 407-410
- Concannon P.W.; (1993)  
Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 3-27

Concannon P.W, Lasley B., Vanderlip S.; (1997)

LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 51: 41-54

Concannon P.W., Cowan R., Hansel W.; (1979a)

LH release in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone.

Biol. Reprod. 20: 523-531

Concannon P.W., Temple M.; (1988)

Perioovulatory decline and late anestrus increase in naloxone inducible LH release in adult domestic bitches.

Biol. Reprod. 36, Suppl. 1: 101

Concannon P.W., Weigand N., Wilson S., Hansel W.; (1979b)

Sexual behavior in ovariectomized bitches in response to estrogen and progesterone treatments.

Biol. Reprod. 20: 799-809

Concannon P.W., Weinstein P., Whaley S., Frank D.; (1987)

Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine.

J. Reprod. Fertil. 81: 175-180

Concannon P.W., Whaley S., Anderson S.P.; (1980)

Increased LH pulse frequency associated with termination of anestrus during the ovarian cycle of the dog.

Biol. Reprod. 34: 119

Corbier P.; (1985)

Sexual differentiation of positive feedback: effect of hour of castration at birth on estradiol-induced luteinizing hormone secretion in immature male rats.

Endocrinology 116: 142-147

Cox N.M., Ramirez J.L., Matamoros I.A., Bennett W.A.; (1988)

Estrogen induces estrus unaccompanied by a preovulatory surge in luteinizing hormone in suckled sows.

Biol. Reprod. 38: 592-596

Day M.L., Imakawa K., Wolfe P.L., Kittok R.J., Kinder J.E.; (1987)

Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion.

Biol. Reprod. 37: 1054-1065

De Luca A., Coupar I.M.; (1996)

Insights into opioid action in the intestinal tract.

Pharmacol. Ther. 69:103-115

Delville Y., Blaustein J.D.; (1991)

A site for estradiol priming of progesterone-facilitated sexual receptivity in the ventrolateral hypothalamus of female guinea pigs.

Brain Res. 559: 191-199

Dixon W.J.; (1993)

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2.

University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

Döcke F.; (1994a)

Prolaktin

F. Döcke Veterinärmedizinische Endokrinologie Gustav Fischer Verlag Jena:

204-211

Döcke F.; (1994b)

Grundlagen der Regulation im Endokrinium

F. Döcke Veterinärmedizinische Endokrinologie Gustav Fischer Verlag Jena:

92-106

Döcke F.; (1994c)

Hypothalamus-Hypophysen-System

F. Döcke Veterinärmedizinische Endokrinologie Gustav Fischer Verlag Jena:  
131-173

Döcke F., Ledwon P., Sturzebecher B., Rohde W., Dörner G.; (1989)

Oestrogen priming for the positive oestrogen feedback: site of action.  
Exp. Clin. Endocrinol. 94: 55-60

Dodson S.E., McLeod B.J., Haresign W., Peters A.R., Lamming G.E.; (1988)

Endocrine changes from birth to puberty in the heifer.  
J. Reprod Fertil. 82: 572-538

Dörner G., Döcke F., Gotz F., Rohde W., Stahl F., Tonjes R.; (1987)

Sexual differentiation of gonadotropin secretion, sexual orientation and gender  
role behavior.  
J. Steroid. Biochem. 27: 1081-1087

Douglass J., Cox B., Quinn B., Civelli O., Herbert E.; (1987)

Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian  
reproductive tissues.  
Endocrinology 120: 707-713

El Etreby M.F., Fath-El-Bab Mr.; (1977)

Localization of gonadotrophic hormones in the dog pituitary gland, A study  
using immunoenzyme histochemistry and chemical staining.  
Cell. Tissue. Res. 183: 167-175

Elsaesser F., Martinat-Botte F., Parvizi N., Terqui M.; (1992)

Oestrus and LH responses to oestradiol during lactational anoestrus in Chinese  
Meishan and large white sows.  
Reprod. Nutr. Dev. 32: 307-312

Elsaesser F., Parvizi N.; (1979)

Estrogen feedback in the pig: sexual differentiation and the effect of prenatal testosterone treatment.

Biol. Reprod. 20: 1187-1193

Elsaesser F., Parvizi N.; (1980)

Partial recovery of the stimulatory oestrogen feedback action on LH release during late lactation in the pig.

J. Reprod. Fertil. 59: 63-67

Endröczy E., Hilliard J.; (1965)

Luteinizing hormone releasing activity in different parts of rabbit and dog brain.

Endocrinology 77: 667-673

England G.C.W., Allen W.E.; (1991)

Repeatability of events during spontaneous and gonadotropin-induced oestrus in bitches.

J. Reprod. Fertil. 93: 443-448

England G.C.W.; (1992)

Vaginal cytology and cervicovaginal mucus aborisation in the breeding management of bitches.

Journal of small Animal Practice 33: 577-582

Esbenshade K.L., Britt J.H.; (1985)

Active immunization of gilts against gonadotropin-releasing hormone: effects on secretion of gonadotropins, reproductive function, and responses to agonists of gonadotropin-releasing hormone.

Biol. Reprod. 33: 569-577

Evans A.C., Adams G.P., Rawlings N.C.; (1994a)

Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 Weeks of age.

J Reprod Fertil 102: 463-470

Evans M.J., Irvine C.H.; (1979)

Induction of follicular development and ovulation in seasonally acyclic mares using gonadotrophin-releasing hormones and progesterone.

J. Reprod. Fertil. Suppl 27: 113-121

Evans N.P., Dahl G.E., Caraty A., Padmanabhan V., Thrun L.A., Karsch F.J.; (1996)

How much of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge is required for generation of the luteinizing hormone surge in the ewe? Duration of the endogenous GnRH signal.

Endocrinology 137: 4730-4773

Evans N.P., Dahl G.E., Glover B.H., Karsch F.J.; (1994b)

Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe.

Endocrinology 134: 1806-1811

Evans N.P., Dahl G.E., Mauger D., Karsch F.J.; (1995a)

Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe.

Endocrinology 136: 1603-1609

Evans N.P., Dahl G.E., Mauger D.T., Padmanabhan V., Thrun L.A., Karsch F.J.; (1995b)

Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system.

Endocrinology 136: 5511-5519

Feldman E.C., Nelson R.W.; (1987)

Canine and feline reproduction.

Canine and feline endocrinology and reproduction,

W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 399-480



- Ferin M., Wehrenberg W.B., Lam N.Y., Alston E.J., Vande Wiele R.L.; (1982)  
Effects and site of action of morphine on gonadotropin secretion in the female rhesus monkey.  
Endocrinology 111: 1652-1656
- Fernandes P. A., Bowen R. A., Kostas A. C., Sawyer H. R., Nett T. M., Olson P. N.; (1987)  
Luteal funktion in the bitch; changes during diestrus in pituitary concentration of an the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin.  
Biol. Reprod. 37: 804-811
- Findlay J.K., Clarke I.J., Robertson D.M.; (1990)  
Inhibin concentrations in ovarian and jugular venous plasma and the relationship of inhibin with follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during the ovine estrous cycle.  
Endocrinology 126: 528-535
- Fink G.; (1988)  
Gonadotropin secretion and its control.  
Raven Press New York; The Physiology of Reproduction: 1349
- Fitzgerald B.P., Affleck K.J., Barrows S.P., Murdoch W.L., Barker K.B., Loy R.G.; (1987)  
Changes in LH pulse frequency and amplitude in intact mares during the transition into the breeding season.  
J. Reprod. Fertil. 79: 485-493
- Foster D.L.; (1984)  
Preovulatory gonadotropin surge system of prepubertal female sheep is exquisitely sensitive to the stimulatory feedback action of estradiol.  
Endocrinology 115: 1186-1189

Foster D.L., Karsch F.J.; (1975)

Development of the mechanism regulating the preovulatory surge of luteinizing hormone in sheep.

Endocrinology 97: 1205-1209

Foxcroft G.R., Elsaesser F., Stickney K., Haynes N.B., Back H.L.; (1984)

Ovarian oestrogen-dependent maturation of the LH/FSH surge mechanism during prepubertal development in the gilt.

J Endocrinol 101: 371-380

Gabriel S.M., Berglund L.A., Simpkins J.W.; (1987)

Chronic morphine treatment enhances the negative and positive feedback effects of estradiol on gonadotropin secretion in ovariectomized rats.

Endocrinology 120: 1799-1805

Gallegos-Sánchez J., Delaleu B., Caraty A., Malpoux B., Thiéry J.C.; (1997)

Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing-hormone release in the female sheep during anestrus.

Biol. Reprod. 56: 1544 – 1549

Garcia M.C., Ginther O.J.; (1978)

Regulation of plasma LH by estradiol and progesterone in ovariectomized mares.

Biol. Reprod. 19: 447-453

Garza F. Jr, Thompson D.L. Jr, French D.D., Wiest J.J., St George R.L., Ashley K.B., Jones L.S., Mitchell P.S., McNeill D.R.; (1986)

Active immunization of intact mares against gonadotropin-releasing hormone: differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone.

Biol. Reprod. 35: 347-352

- Gazal O.S., Leshin L.S., Stanko R.L., Thomas M.G., Keisler D.H., Anderson L.L., Williams G.L.; (1998)  
Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y.  
Biol. Reprod. 59: 676-683
- Genazzani A.R., Petraglia F., Mercuri N., Brilli G., Genazzani A.D., Bergamaschi M., DeRamundo B.M., Volpe A.; (1990)  
Effect of steroid hormones and antihormones on hypothalamic beta-endorphin concentrations in intact and castrated female rats.  
J. Endocrinol. Invest. 13: 91-96
- Gerres S.; (1991)  
Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der Pseudogravidität der Hündin.  
Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen
- Girmus R.L., Wise M.E.; (1991)  
Direct pituitary effects of estradiol and progesterone on luteinizing hormone release, stores, and subunit messenger ribonucleic acids.  
Biol. Reprod. 45: 128-124
- Glasier A., McNeilly A.S., Howie P.W.; (1984)  
Pulsatile secretion of LH in relation to the resumption of ovarian activity post partum.  
Clin. Endocrinol. 20: 415-426
- Gluckman P.D., Marti-Henneberg C., Kaplan S.L., Grumbach M.M.; (1983)  
Hormone ontogeny in the ovine fetus: XIV. The effect of 17 beta-estradiol infusion on fetal plasma gonadotropins and prolactin and the maturation of sex steroid-dependent negative feedback.  
Endocrinology 112: 1618-1623

Goldsmith P.C., Boggan J.E., Thind K.K.; (1997)

Estrogen and progesterone receptor expression in neuroendocrine and related neurons of the pubertal female monkey hypothalamus.

Neuroendocrinology 65: 325-334

Goodman R.L., Karsch F.J.; (1980)

Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids.

Endocrinology 107: 1286-1290

Goodman R.L., Knobil E.; (1981)

The sites of action of ovarian steroids in the regulation of LH secretion.

Neuroendocrinology 32: 57-63

Gordon K., Renfree M.B., Short R.V., Clarke I.J.; (1987)

Hypothalamo-pituitary portal blood concentrations of beta-endorphin during suckling in the ewe.

J. Reprod. Fertil. 79: 397-408

Gordon K., Siegmann M.; (1991)

Suckling behavior of ewes in early lactation.

Physiol. Behav. 50: 1079-1081

Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S.; (1963)

The preparation of <sup>131</sup>I labelled human growth hormone of high specific radioactivity.

Biochemical J. 89: 336-341

Guillemin R., Burgus R.; (1972)

The hormones of the hypothalamus.

Sci. Am. 227: 24-33

Günzel Apel A.R., Hille P., Hoppen H.-O.; (1994)

Spontaneous and GnRH induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal, adult and aging male Beagles.

Theriogenology 41 (3): 737-745

- Haaften van B., Bevers M. M., Brom van den W. E., Okkens A.C., Sluijs van F.J., Willemse A.H., Dieleman S.J.; (1994)  
Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch.  
J. Reprod. Fertil. 101: 221-225
- Haaften van, B., Dieleman, S. J., Okkens, A. C., Bevers M. M., Willemse A. H.; (1989)  
Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 39: 330-331
- Hamada H., Kishioka S., Yamoto M., Nakano R.; (1995)  
[3H]naloxone binding sites in porcine ovarian follicles and corpora lutea during the ovarian cycle.  
Eur. J. Endocrinol. 132: 622-626
- Hamernik D.L., Nett T.M.; (1988)  
Gonadotropin-releasing hormone increases the amount of messenger ribonucleic acid for gonadotropins in ovariectomized ewes after hypothalamic-pituitary disconnection.  
Endocrinology 122: 959-966
- Hammer R.P. Jr, Zhou L., Cheung S.; (1994)  
Gonadal steroid hormones and hypothalamic opioid circuitry.  
Horm. Behav. 28: 431-437
- Harlan R.E., Shivers B.D., Romano G.J., Howells R.D., Pfaff D.W.; (1987)  
Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization.  
J. Comp. Neurol. 258: 159-184
- Hayer P., Günzel-Apel A.R., Luerssen D., Hoppen H.O.; (1993)  
Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 93-100

Hines K.K., Affleck K.J., Barrows S.P., Murdoch W.L., Fitzgerald B.P., Loy R.G.;  
(1991)

Follicle-stimulating hormone pulse amplitude decreases with the onset of the  
breeding season in the mare  
Biol. Reprod. 44: 516-521

Hoffmann B.; (1999)

Endokrinologische Grundlagen der Regulation der Sexualfunktionen.  
Parey Buchverlag Berlin; Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind; 14-16

Hoffmann B., Büttner G.; (1998)

Biochemical and immunohistochemical investigations on the occurrence of the  
estrogen receptor in the canine uterus during the estrous cycle  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 106, p 55

Hoffmann B., Gerres S.; (1989)

Modellversuch zur Darstellung der antigestagenen Wirkung von RU 38486 bei  
der Hündin.  
Wiener Tierärztl. Mschr. 76: 10-14

Hoffmann B., Höveler R., Hasan S.H., Failing K.; (1992)

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.  
J. Reprod. Fertil. 96: 837-845

Hoffmann B., Kyrein H.J., Ender M.L.; (1973)

An efficient procedure for the determination of progesterone by  
radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.  
Hormone Research 4: 302-310

Hoffmann B., Riesenbeck A., Klein R.; (1996)

Reproductive endocrinology of bitches.  
Anim. Reprod. Sci. 42: 275-288

Hoffmann B., Riesenbeck A., Schams D., Steinetz B.G.; (1999)

Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog  
Reprod. Dom. Anim. 34: 219-226

Hoffmann B., Schneider, S.; (1993)

Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrous cycle in the dog.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 85-91

Hohlweg W., Junkmann K.; (1932)

Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens.  
Klin. Wschr. 11: 321-323

Horton R.J., Clarke I.J.; (1988)

Lack of an effect of morphine or naloxone on the oestrogen-induced LH surge in anoestrous ewes.

J. Endocrinol. 119: 89-93

Horton R.J., Francis H., Clarke I.J.; (1989)

Seasonal and steroid-dependent effects on the modulation of LH secretion in the ewe by intracerebroventricularly administered beta-endorphin or naloxone.

J. Endocrinol. 122: 509-517

Höveler R.; (1991)

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Ovarfunktion bei der graviden und ingraviden Hündin.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen

Huffman L.J., Inskeep E.K., Goodman R.L.; (1987)

Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb.

Biol. Reprod. 37: 755-761

Hunter W.K., Greenwood F.C.; (1962)

Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.

Nature 194: 495-496

Hurt Y.L.; (1996)

Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain.

Neuroscience 72: 767-783

Hyland J.H., Wright P.J., Clarke I.J., Carson R.S., Langsford D.A., Jeffcott L.B.; (1987)

Infusion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) induces ovulation and fertile oestrus in mares during seasonal anoestrus.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 35: 211-220

Jansen H.T., Jackson G.L.; (1993)

Circannual rhythms in the ewe: patterns of ovarian cycles and prolactin secretion under two different constant photoperiods.

Biol. Reprod. 49: 627-634

Jarry H., Hirsch B., Leonhardt S., Wuttke W.; (1992)

Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release.

Neuroendocrinology 56: 133-140

Jarry H., Leonhardt S., Schwarze T., Wuttke W.; (1995)

Preoptic rather than mediobasal hypothalamic amino acid neurotransmitter release regulates GnRH secretion during the estrogen-induced LH surge in the ovariectomized rat.

Neuroendocrinology 62: 479-486

Jarry H., Leonhardt S., Wuttke W.; (1991)

Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats.

Neuroendocrinology 53: 261-267

Jeffcoate I.A.; (1993)

Endocrinology of anoestrous bitches

J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 69-76



Jeukenne P, Verstegen J.; (1997)

Termination of dioestrus and induction of oestrus in dioestrous nonpregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 51: 59-66

Johnson A.L.; (1986)

Induction of ovulation in anestrus mares with pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone.

Am. J. Vet. Res. 47: 983-986

Johnson A.L.; (1987)

Gonadotropin-releasing hormone treatment induces follicular growth and ovulation in seasonally anestrus mares.

Biol. Reprod. 36: 1199-1206

Johnston P.G., Davidson J.M.; (1979)

Priming action of estrogen: minimum duration of exposure for feedback and behavioral effects.

Neuroendocrinology 28: 155-159

Jones G.E., Boyns A.R., Cameron E.H.D., Bell E.T., Christie D.W., Parkes M.F.; (1973)

Plasma oestradiol, luteinizing hormone and progesterone during the oestrous cycle in the beagle bitch.

J. Endocrinology 57: 331-332

Kaneko H., Nakanishi Y., Akagi S., Arai K., Taya K., Watanabe G., Sasamoto S., Hasegawa Y.; (1995)

Immunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows.

Biol. Reprod. 53: 931-939

Karlberg K.; (1980)

Factors affecting postweaning oestrus in the sow.

Nord. Vet. Med. 32: 185-193

Karsch F.J., Cummins J.T., Thomas G.B., Clarke I.J.; (1987)

Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe.

Biol. Reprod. 36: 1207-1218

Karsch F.J., Dahl G.E., Evans N.P., Manning J.M., Mayfield K.P., Moenter S.M., Foster D.L.; (1993)

Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol.

Biol. Reprod. 49: 1377-1383

Kasa-Vubu J., Dahl G.E., Evans N.P., Thrun L.A., Moenter S.M., Padmanabhan V., Karsch F.J.; (1992)

Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone.

Endocrinology 131: 208-212

Kennaway D.J., Rowe S.A.; (1995)

Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 49: 423-435

Kesner J.S., Price-Taras E.A., Kraeling R.R., Rampacek G.B., Barb C.R.; (1989)

Negative feedback as an obligatory antecedent to the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs.

Biol. Reprod. 41: 409-413

Kobayashi R., Harada A., Kotani M., Yamada T., Wakabayashi K.; (1978)

An increase of pituitary 3', 5' cyclic adenosine monophosphate produced by estradiol benzoate in vitro: possible implication of this increase in the secretion of luteinizing hormone.

Horm. Metab. Res. 10: 237-242

Kooistra L.H., Ginther O.J.; (1975)

Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares.

Am. J. Vet. Res. 36: 1413-1419

- Kraeling R.R., Johnson B., Barb C.R., Rampacek G.B.; (1998)  
Evidence for a luteinizing hormone surge center in the hypothalamus of the pig.  
Biol. Reprod. 58: 1199-1205
- Krey L.C., Butler W.R., Knobil E.; (1975)  
Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function  
in the rhesus monkey. I. Gonadotropin secretion.  
Endocrinology 96: 1073-1087
- Krey L.C., Parsons B.; (1982)  
Characterization of estrogen stimuli sufficient to initiate cyclic luteinizing  
hormone release in acutely ovariectomized rats.  
Neuroendocrinology 34: 315-322
- Kumar V.; (1997)  
Photoperiodism in higher vertebrates: an adaptive strategy in temporal  
environment.  
Indian J. Exp. Biol. 35: 427-437
- Kumar M.S., Chen C.L., Kalra S.P.; (1980)  
Distribution of luteinizing hormone releasing hormone in the canine  
hypothalamus: effect of castration and exogenous gonadal steroids.  
Am. J. Vet. Res. 41: 1304–1309
- Lamming G.E., Wathes D.C., Peters A.R.; (1981)  
Endocrine patterns of the post-partum cow.  
J. Reprod. Fertil. 30: 155-170
- Land R.B., Carr W.R., McNeilly A.S., Preece R.D.; (1980)  
Plasma FSH, LH, the positive feedback of oestrogen, ovulation and luteal  
function in the ewe given bromocriptine to suppress prolactin during seasonal  
anoestrus.  
J. Reprod. Fertil. 59: 73-78

Landefeld T., Maurer R., Kepa J.; (1985)

Luteinizing hormone beta-subunit mRNA amounts increase during the preovulatory surge of luteinizing hormone in the ewe: the highest levels are observed at the completion of the peak.

DNA 4: 249-254

Leavitt W.W., Cobb A.D., Takeda A.; (1987)

Progesterone-modulation of estrogen action: rapid down regulation of nuclear acceptor sites for the estrogen receptor.

Adv. Exp. Med. Bio. 230: 49-78

Legan S.J., I'Anson H., Fitzgerald B.P., Akaydin M.S. Jr.; (1985a)

Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycles in anestrus ewes.

Endocrinology 117: 1530-1536

Legan S.J., I'Anson H., Fitzgerald B.P., Fitzovich D.; (1985b)

Does the seasonal increase in estradiol negative feedback prevent luteinizing hormone surges in anestrus ewes by suppressing hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse frequency?

Biol. Reprod. 33: 117-131

Lehman M.N., Durham D.M., Jansen H.T., Adrian B., Goodman R.L.; (1996)

Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrus, but not breeding season, ewes.

Endocrinology 137: 4443-4450

Lira S.A., Phipps D.W. Jr, Sarkar D.K.; (1986)

Loss of estradiol-positive feedback action on LH release during prepubertal period in rats treated postnatally with an opiate antagonist.

Neuroendocrinology 44: 331-337

Lundblad E.G., Williams R.F., Hodgen G.D.; (1980)

Rapid recovery of estrogen-induced pituitary gonadotropin surges after  
luteectomy in rhesus monkeys.

Steroids 36: 349-354

Mann P.E., Rubin B.S., Bridges R.S.; (1997)

Differential proopiomelanocortin gene expression in the medial basal  
hypothalamus of rats during pregnancy and lactation.

Brain Res. Mol. Brain Res. 46: 9-16

Martini L., Dondi D., Limonta P., Maggi R., Piva F.; (1989)

Modulation by sex steroids of brain opioid receptors: implications for the  
control of gonadotropins and prolactin secretion.

J. Steroid. Biochem. 33: 673-681

Marut E.L., Williams R.F., Cowan B.D., Lynch A., Lerner S.P., Hodgen G.D.; (1981)

Pulsatile pituitary gonadotropin secretion during maturation of the dominant  
follicle in monkeys: estrogen positive feedback enhances the biological activity  
of LH.

Endocrinology 109: 2270-2272

Matteri R.L., Dierschke D.J., Bridson W.E., Rhutasel N.S., Robinson J.A.; (1990)

Regulation of the biopotency of primate luteinizing hormone by gonadotropin-  
releasing hormone in vitro and in vivo.

Biol. Reprod. 43: 1045-1049

McCue P.M., Troedsson M.H., Liu I.K., Stabenfeldt G.H., Hughes J.P., Lasley B.L.;  
(1991)

Follicular and endocrine responses of anoestrous mares to administration of  
native GnRH or a GnRH agonist.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 44: 227-233

McLeod B.J., Haresign W., Lamming G.E.; (1982)

Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of Gn-RH with and without progesterone pretreatment.

J. Reprod. Fertil. 65: 223-230

McNatty K.P., Gibb M., Dobson C., Thurley D.C.; (1981)

Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe.

J. Endocrinol. 90: 375-389

McNatty K.P., Hudson N., Gibb M., Ball K., Fannin J., Kieboom L., Thurley D.C.; (1984)

Effects of long-term treatment with LH on induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes.

J. Endocrinol. 100: 67-73

McShane M.T., Keisler D.H.; (1991)

Effects of dietary energy on ovarian function, estrogen suppression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, and competency of the gonadotropin surge.

Biol. Reprod. 45: 486-492

Meijs-Roelofs H.M., Kramer P., Sander H.J.; (1983)

Changes in serum concentration of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty.

J. Endocrin. 98: 241-249

Meikle A., Tasende C., Garófalo E.G., Forsberg M.; (1998)

Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs.

Anim. Reprod. Sci. 54: 75-85

Mercer J.E., Clements J.A., Funder J.W., Clarke I.J.; (1988)

Luteinizing hormone-beta mRNA levels are regulated primarily by gonadotropin-releasing hormone and not by negative estrogen feedback on the pituitary.

Neuroendocrinology 47: 563-566

Mercer J.E., Phillips D.J., Clarke I.J.; (1993)

Short-term regulation of gonadotropin subunit mRNA levels by estrogen: studies in the hypothalamo-pituitary intact and hypothalamo-pituitary disconnected ewe.

J. Neuroendocrinol. 5: 591-596

Merchenthaler I., Maderdrut J.L., Cianchetta P., Shughrue P, Bronstein D.; (1997)

In situ hybridization histochemical localization of prodynorphin messenger RNA in the central nervous system of the rat.

J. Comp. Neurol. 384: 211-232

Moenter S.M., Brand R.C., Karsch F.J.; (1992)

Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction.

Endocrinology 130: 2978-2984

Moenter S.M., Caraty A., Karsch F.J.; (1990)

The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe.

Endocrinology 127: 1375-1384

Moenter S.M., Caraty A., Locatelli A., Karsch F.J.; (1991)

Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge.

Endocrinology 129: 1175-1182

Monniaux D., Huet C., Besnard N., Clément F., Mariana J.C., Bosc M., Monget P.; (1997)

Follicular growth and ovarian dynamics.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 51: 3-23

- Nagahara Y., Miyake A., Tasaka K., Kawamura Y., Aono T., Tanizawa O.; (1985)  
Possible site of negative and positive feedback action of oestrogen on gonadotropin secretion in normal women.  
*Acta Endocrinol. (Copenh.)* 108: 440-444
- Nakai Y., Plant T.M., Hess D.L., Keogh E.J., Knobil E.; (1978)  
On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey.  
*Endocrinology* 102: 1008-1014
- Nass T.E., Terasawa E., Dierschke D.J., Goy R.W.; (1984)  
Developmental changes in luteinizing hormone secretion in the female guinea pig. II. Positive feedback effects of ovarian steroids.  
*Endocrinology* 115: 227-232
- Nequin L.G., King S.S., Matt K.S., Jurak R.C.; (1990)  
The influence of photoperiod on gonadotropin-releasing hormone stimulated luteinising hormone release in the anoestrous mare.  
*Equine Vet. J.* 22: 356-358
- Okkens A.C., Bevers M.M.; (1990)  
Evidence for prolactin as the main luteotropic factor in the cyclic dog.  
*Veterinary Quarterly* 12: 193-201
- Okkens A.C., Dieleman S.J., Bevers M.M., Lubbernink A.A.M.E., Willemse A.H.; (1986)  
Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog.  
*J. Reprod. Fertil.* 77: 187-192
- Okkens A.C., Kooistra H.S., Dieleman S.J., Bevers M.M.; (1997)  
Dopamine-agonistic effects as opposed to the prolactin concentrations as the influencing factor on the length of the anoestrus in the dog.  
*J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 55-58



- Okrasa S., Kalamarż H., Tilton J.E., Ziecik A.J.; (1992)  
Influence of opioids on LH secretion in gilts during the estrous cycle.  
J. Physiol. Pharmacol. 43(4 Suppl 1): 105-116
- Olson P.N., Bowen R.A., Behrendt M.O., Olson J.D., Nett T.M.; (1982a)  
Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late  
anestrus, proestrus and estrus.  
Biol. Reprod. 27: 1196-1206
- Olson P.N., Bowen R.A., Behrendt M.O., Olson J.D., Nett T.M.; (1984)  
Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrus  
bitches before and after hysterectomy.  
Am. J. Vet. Res. 45: 149-153
- Olson P.N., Mulnix J.A., Nett T.M.; (1992)  
Concentration of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the  
serum of sexually intact and neutered dogs.  
Am. J. Vet. Res. 53: 762-766
- Olson, P. N., Bowen R. A., Nett T. M.; (1982b)  
Hormonal changes in the bitch during the onset of proestrus.  
Biol. Reprod. Suppl. 1/26: 82 a
- Onclin K., Verstegen J., Silva L.D.M., Concannon P.; (1995)  
Patterns of circulating prolactin, LH and FSH during dopamine-agonist induced  
termination of anestrus in beagle dogs.  
Biol. Reprod. Suppl. 52: 314
- Onclin K., Verstegen J.P.; (1997a)  
In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopa-  
mine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and  
-diestrus.  
Domest. Anim. Endocrinol. 14: 25-38

Onclin K., Verstegen J.P.; (1997b)

Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches.

J Reprod Fertil Suppl 51: 203-208

Onlcin K., Silva L.D.M., Concannon P.; (1993)

Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 403-409

Oxender W.D., Noden P.A., Hafs H.D.; (1977)

Estrus, ovulation, and serum progesterone, estradiol, and LH concentrations in mares after an increased photoperiod during winter.

Am. J. Vet. Res. 38: 203-207

Padmanabhan V., Evans N.P., Dahl G.E., McFadden K.L., Mauger D.T., Karsch F.J.; (1995)

Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion.

Neuroendocrinology 62: 248-258

Pantke P., Hyland J., Galloway D.B., MacLean A.A, Hoppen H.O.; (1991)

Changes in luteinizing hormone bioactivity associated with gonadotrophin pulses in the cycling mare.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 44: 13-18

Parvisi N.; (1994)

Endogene Opioide und Melanozytenstimulierendes Hormon

F. Döcke Veterinärmedizinische Endokrinologie Gustav Fischer Verlag Jena:

212-224

Pearce G.P., Pearce A.N.; (1992)

Contact with a sow in oestrus or a mature boar stimulates the onset of oestrus in weanes sows.

Vet. Rec. 130: 5-9

- Peltoniemi O.A., Love R.J., Heinonen M., Tuovinen V., Saloniemi H.; (1999)  
Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study.  
*Anim. Reprod. Sci.* 55: 47-61
- Petersen S.L., Barraclough C.A.; (1989)  
Suppression of spontaneous LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats  
by microimplants of antiestrogens into the preoptic brain.  
*Brain Res.* 484: 279-289
- Phillips D.J., Cummins J.T., Clarke I.J.; (1990)  
Effects of modifying gonadotropin-releasing hormone input before and after the  
oestrogen-induced LH surge in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary  
disconnection.  
*J. Endocrinol.* 127: 223-233
- Porter M.B., Cleaver B.D., Peltier M., Robinson G., Sharp D.C.; (1997)  
The effect of pulsatile gonadotropin-releasing hormone and estradiol  
administration on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone  
concentrations in pituitary stalk-sectioned ovariectomized pony mares.  
*Domest. Anim. Endocrinol.* 14: 275-285
- Priest C.A., Eckersell C.B., Micevych P.E.; (1995)  
Estrogen regulates preproenkephalin-A mRNA levels in the rat ventromedial  
nucleus: temporal and cellular aspects.  
*Brain Res. Mol. Brain Res.* 28: 251-262
- Quesnel H., Prunier A.; (1995)  
Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow.  
*Reprod. Nutr. Dev.* 35: 395-414
- Rangaraj N., Gupta P.D.; (1997)  
Responsiveness of vaginal cells to estradiol during postnatal development of rat.  
*Recept. Signal. Transduct.* 7: 291-298

Reame N., Sauder S.E., Kelch R.P., Marshall J.C.; (1984)

Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 59: 328-337

Richardson D.W., Gordon K., Billiar R.B., Little A.B.; (1992)

Chronic hyperestrogenemia: lack of positive feedback action on gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone release and dual site of negative feedback action.

Endocrinology 130: 1090-1096

Riesenbeck A.; (1997)

Untersuchungen über die Verfügbarkeit von LH bei ingraviden und graviden Hündinnen und zur Bedeutung des Regelfaktors PGF2 $\alpha$  für die Luteolyse im peripartalen Zeitraum.

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen

Robinson J.E., Radford H.M., Karsch F.J.; (1985)

Seasonal changes in pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in the ewe relationship of frequency of LH pulses to day length and response to estradiol negative feedback.

Biol. Reprod. 33: 324–334

Rosie R., Thomson E., Fink G.; (1990)

Oestrogen positive feedback stimulates the synthesis of LHRH mRNA in neurones of the rostral diencephalon of the rat.

J. Endocrinol. 124: 285-289

Safir J.M., Loy R.G., Fitzgerald B.P.; (1987)

Inhibition of ovulation in the mare by active immunization against LHRH.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 35: 229-237

Schallenberg E., Prokopp S.; (1985a)

Gonadotropins and ovarian steroids in cattle. IV. Re-establishment of the stimulatory feedback action of Estradiol-17 $\beta$  and FSH.

Acta Endocrinol. (Copenh) 109: 44-49

Schallenberg E., Schöndorfer A.M., Walters D.L; (1985b)

Gonadotropins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle.

Acta Endocrinol. (Copenh) 108: 312-321

Schally A.V., Kastin A.J., Arimura A.; (1971b)

Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies.

Fertil. Steril. 22: 703-721

Schally A.V., Nair R.M., Redding T.W., Arimura A.; (1971a)

Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami.

J. Biol. Chem. 246: 7230-7236

Schneider S.; (1993)

Untersuchungen zur Freisetzung von LH während des Zyklus der Hündin  
Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität  
Gießen

Schramm R.D., Roberge S., Reeves J.J.; (1991)

Enclomiphene does not alter the postpartum interval of suckled beef cows

J. Anim. Sci. 69: 4112-4116

Selcer K.W., Leavitt W.W.; (1988)

Progesteron down-regulation of nuclear estrogen receptor: a fundamental mechanism in bird and mammals.

Gen. Comp. Endocrinol. 72: 443-452

Sharp D.C., Kooistra L., Ginther O.J.; (1975)

Effects of artificial light on the oestrous cycle of the mare.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 23: 241-246

Shen P.J., Smith A.I., Evans R.G., Clarke I.J.; (1995)

Effects of ovarian steroids on hypothalamic opioid receptor subtypes in ovariectomized ewes: regional changes in density and affinity.

J. Endocrinol. 145: 559-567

Short R.E., Randel R.D., Staigmiller R.B., Bellows R.A.; (1979)

Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow.

Biol. Reprod. 21: 683-689

Silvia P.J., Squires E.L., Nett T.M.; (1986)

Changes in the hypothalamic-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence.

Biol. Reprod. 35: 897-905

Silvia P.J., Squires E.L., Nett T.M.; (1987)

Pituitary responsiveness of mares challenged with GnRH at various stages of the transition into the breeding season.

J. Anim. Sci. 64: 790-796

Sjoberg I., Rylander E., von Schoultz B.; (1989)

Menstrual variation of estrogen receptor content in vaginal tissue.

Gynecol. Obstet. Invest. 27: 48-51

Smollich A., Döcke F.; (1977)

Karyovolumetric studies on possible central-nervous-system action sites of the positive estrogen feedback.

Arch. Exp. Veterinärmed. 31: 257-263

Souza C.J.H., Campbell B.K., Baird D.T.; (1996)

Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrous.

J. Reprod. Fertil. 108: 101-106

Sprangers S.A., Piacsek B.E.; (1997)

Chronic underfeeding increases the positive feedback efficacy of estrogen on gonadotropin secretion.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 216: 398-403

Stewart K.J.; (1988)

Suckling and lactational anoestrus in wild gorillas (*Gorilla gorilla*).

J. Reprod. Fertil. 83: 27-34

Swanson L.V., McCarthy S.K.; (1986)

Steroid hormone feedback on LH in prepubertal Holstein heifers.

Steroids 47: 101-114

Tanaka T., Ozawa T., Hoshino K., Mori Y.; (1995)

Changes in the gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during the estrous cycle in the goat.

Neuroendocrinology 62: 553-561

Tani H., Inaba T., Matsuyama S., Takamori Y., Torii R., Takano H., Tamada H., Sawada T., (1997)

Enhancement of estrogen receptor gene expression in the mediobasal hypothalamus during anestrus in the beagle bitch

Neurosci. Lett. 227: 149-152

Tani H., Inaba T., Tamada H., Sawada T., Mori J., Torii R.; (1996)

Increasing gonadotropin-releasing hormone release by perfused hypothalamus from early to late anestrus in the beagle bitch.

Neurosci. Lett. 207: 1-4

Thom B., Canny B.J., Cowley M., Wright P.J., Clarke I.J.; (1996)

Changes in the binding characteristics of the  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  subtypes of the opioid receptor in the hypothalamus of the normal cyclic ewe and in the ovariectomised ewe following treatment with ovarian steroids.

J. Endocrinol. 149: 509-518

Thomas G.B., Cummins J.T., Doughton B.W., Griffin N., Smythe G.A., Gleeson R.M., Clarke I.J.; (1989)

Direct pituitary inhibition of prolactin secretion by dopamine and noradrenaline in sheep.

J. Endocrinol. 123: 393-402

Thomas S.G., Clarke I.J.; (1997)

The positive feedback action of estrogen mobilizes LH-containing, but not FSH-containing secretory granules in ovine gonadotropes.

Endocrinology 138: 1347-1350

Turgeon J.L., Waring D.W.; (1981)

Acute progesterone and 17 beta-estradiol modulation of luteinizing hormone secretion by pituitaries of cycling rats superfused in vitro.

Endocrinology 108: 413-419

Turzillo A.M., DiGregorio G.B., Nett T.M.; (1995)

Messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptor and numbers of gonadotropin-releasing hormone receptors in ovariectomized ewes after hypothalamic-pituitary disconnection and treatment with estradiol.

J. Anim. Sci. 73: 1784-1788

Vanderlip S.L., Wing A.E., Peggy F., Linkie D., Rivier J., Concannon P.W., Lasley B.L.; (1987)

Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone.

Lab. Animal. Sci. 37: 459-464

Vermeirsch H., Simoens P., Lauwers H., Coryn M.; (1999)

Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels.

Theriogenology 51: 729-743



Vemer H.M., Rolland R.; (1982)

The influence of exogenous oestradiol benzoate on the pituitary responsiveness to LHRH during the puerperium in women.

Clin. Endocrinol. (Oxf) 16: 251-258

Verstegen J., Onclin K., Silva L., Concannon P.; (1997)

Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH.

J. Reprod. Fertil. 111: 35-40

Verstegen J., Onclin K., Wouters-Ballman P.; (1996)

Remnant progesterone production by the corpus luteum of the anoestrus ovary and its role in anoestrus regulation in bitches

3rd International Symposium on Reproduction of Dogs, Cats and Exotic carnivores, Utrecht, Netherlands, September 12-14, 50

Verstegen J.P., Onclin K., Sliva L., Concannon P.; (1999)

Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs.

Theriogenology 51: 597-611

Verstegen J.P.L., Onclin K., Silva L.D.M., Concannon P.W.; (1993)

Early termination of anestrus and induction of fertile estrus in dogs by the dopamine super-agonist cabergoline.

Biol. Reprod. 48 Suppl. 1: 127: 276

Walsh J.P., Clarke I.J.; (1996)

Effects of central administration of highly selective opioid mu-, delta- and kappa-receptor agonists on plasma luteinizing hormone (LH), prolactin, and the estrogen-induced LH surge in ovariectomized ewes.

Endocrinology 137: 3640-3648

Walsh J.P., Clarke I.J.; (1998)

Blockade of the oestrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes by a highly selective opioid mu-receptor agonist: evidence for site of action.

Neuroendocrinology 67: 164-170

Webster J.R., Moenter S.M., Barrell G.K., Lehman M.N., Karsch F.J.; (1991a)

Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep.

Endocrinology 129: 1635-1643

Webster J.R., Moenter S.M., Woodfill C.J., Karsch F.J.; (1991b)

Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep.

Endocrinology 129: 176-183

Wehr T.A.; (1997)

Melatonin and seasonal rhythms.

J. Biol. Rhythms. 12: 518-527

Weiland N.G., Wise P.M.; (1990)

Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions.

Endocrinology 126: 804-808

Wong T.M., Sheng J.Z., Wong N.S., Tai K.K.; (1995)

Signal transduction in the cardiac k-receptor.

Biol. Signals 4: 174-178

Worthy K., Haresign W., Dodson S., McLeod B.J., Foxcroft G.R., Haynes N.B.; (1985)

Evidence that the onset of the breeding season in the ewe may be independent of decreasing plasma prolactin concentrations.

J. Reprod. Fertil. 75: 237-246

Worthy K., Haresign W.; (1983)

Evidence that the onset of seasonal anoestrus in the ewe may be independent of increasing prolactin concentrations and daylength.

J. Reprod. Fertil. 69: 41-48

Wun W.S., Thorneycroft I.H.; (1987)

Estradiol positive feedback on the rat anterior pituitary gland in vitro.

Mol. Cell. Endocrinol. 54: 165-169

Xia L., Van Vugt D., Alston E.J., Luckhaus J., Ferin M.; (1992)

A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey.

Endocrinology 131: 2812-2820

Xue J.L., Dial G.D., Marsh W.E., Davies P.R.; (1994)

Multiple manifestations of season on reproductive performance of commercial swine.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 204: 1486-1489

Yamashita S., Newbold R.R., McLachlan J.A., Korach K.S.; (1989)

Developmental pattern of estrogen receptor expression in female mouse genital tracts.

Endocrinology 125: 2888-2896

Yamashita K.; (1966)

Interstitial cell stimulating hormone releasing activity of hypothalamic extracts in the dog.

J. Endocrinol. 35: 401-408

Yamashita K., Mieno M., Yamashita E.; (1979)

Suppression of the luteinizing hormone releasing effect of luteinizing hormone releasing hormone by arginine-vasotocin.

J. Endocrinol. 81: 103-108

Young D.W., Kemppainen, R.J.:(1994)

Molecular forms of  $\beta$ -Endorphin in the canine pituitary gland.

Am. J. Vet. Res. 55: 567-561

Zhu Y., Pinar J.E.; (1998)

Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta.

Biol. Reprod. 59: 925-932

Ziecik A.J., Britt J.H., Esbenshade K.L.; (1988)

Short loop feedback control of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in pigs.

Endocrinology 122: 1658-1652

### **Danksagung:**

Herrn Prof. Hoffmann möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas, sowie die stets gewährte Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Schams, Institut für Physiologie im Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel – Technische Universität München, Freising – Weihenstephan möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die radioimmunologische Bestimmung von LH in seinem Labor durchzuführen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei den technischen Mitarbeiterinnen im Labor dieses Instituts bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Failing für die gewährte Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen im Labor der Professur „Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II“ möchte ich mich für die stets geleistete Hilfe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die aufgebrachte Geduld, sowie für die moralische und finanzielle Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.